

INTISARI

Kulit buah kakao (*Cocoa Pod Husk*, CPH) merupakan produk samping dari pengolahan biji kakao yang jumlahnya sebesar 70-75% dari berat buah kakao. Komponen penyusun CPH terdiri atas selulosa, hemiselulosa, lignin dan bahan ekstraktif. Komponen penyusun CPH adalah 24,51% selulosa, 23,36% hemiselulosa, dan 30,46% lignin. Selulosa dapat dikonversi lebih lanjut menjadi asam laktat, salah satu bahan baku yang banyak dimanfaatkan pada industri makanan sebagai bahan pengawet daging, sayuran atau ikan kalengan. Dalam industri farmasi, asam laktat digunakan sebagai bahan baku pembuatan obat-obatan. Dalam penelitian ini, asam laktat hasil fermentasi CPH dikembangkan lebih lanjut menjadi poli asam laktat (PLA). Material PLA merupakan plastik ramah lingkungan yang banyak digunakan untuk keperluan medis.

Konversi CPH menjadi PLA dilakukan melalui serangkaian proses yang mencakup delignifikasi untuk menghilangkan lignin, hidrolisis untuk memecah polimer selulosa menjadi glukosa, fermentasi glukosa menjadi asam laktat menggunakan mikroorganisme, dan polimerisasi asam laktat menjadi PLA. Tantangan yang dihadapi dengan bahan baku kompleks seperti CPH adalah kemungkinan munculnya senyawa-senyawa *inhibitor* yang bisa mengganggu proses fermentasi glukosa menjadi asam laktat.

CPH mengandung senyawa aktif alkaloid dan flavonoid yang diperkirakan menjadi *inhibitor* pada proses fermentasi asam laktat menggunakan mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk membuat PLA dari CPH dengan mempelajari lebih lanjut adanya pengaruh alkaloid dan flavonoid pada proses fermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus plantarum*. Studi yang dilakukan mencakup empat tahap, yaitu: 1) Penentuan konsentrasi sodium hidroksida dan suhu yang relatif baik untuk proses delignifikasi, 2) Penentuan konsentrasi asam sulfat dan suhu yang relatif baik untuk proses hidrolisis asam dan penentuan konsentrasi enzim-CPH dan suhu yang relatif baik untuk proses hidrolisis enzim, 3) Evaluasi efek alkaloid dan flavonoid untuk menentukan konsentrasi maksimum alkaloid dan flavonoid yang masih dapat menghasilkan asam laktat tanpa efek *inhibitor* yang signifikan, dan 4) Karakterisasi PLA yang dihasilkan.

Delignifikasi menggunakan larutan sodium hidroksida dilakukan pada suhu kamar dan suhu tinggi untuk membandingkan pengaruhnya terhadap perubahan komposisi lignoselulosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa delignifikasi CPH dengan larutan sodium hidroksida mencapai kondisi optimum pada konsentrasi 1,5 M, suhu 220 °C dengan durasi proses selama 10 menit. Pada kondisi ini diperoleh penurunan kadar lignin sebesar 81,73%, penurunan kadar hemiselulosa sebesar 90,81%, dan kenaikan kadar selulosa sebesar 91,25%. Alkaloid dan flavonoid juga mengalami penurunan cukup signifikan sebesar 88,24% dan 84,47% dibanding kandungan mula-mula pada CPH segar.

Hidrolisis menggunakan larutan asam sulfat encer dan enzim terhadap CPH terdelignifikasi, dimana hidrolisis asam mencapai kondisi optimum pada konsentrasi asam sulfat 2,0%, suhu 120 °C dengan durasi proses selama 30 menit yang menghasilkan konversi selulosa menjadi glukosa sebesar 9,29%. Hidrolisis

menggunakan enzim terhadap CPH terdelignifikasi mencapai kondisi optimum pada rasio enzim-CPH 8%, suhu 50 °C dengan durasi proses selama 6 jam yang menghasilkan konversi selulosa menjadi glukosa sebesar 18,41%.

Fermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus plantarum* dilakukan pada suhu 50 °C, agitasi 100 rpm dalam *incubator shaker* selama 48 jam. Proses ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan alkaloid dan flavonoid dengan melakukan analisis melalui perbandingan antara konsumsi substrat (glukosa), berat kering sel, dan produksi asam laktat. Adapun variasi konsentrasi alkaloid 1; 2; 2,5; 3; dan 3,5 g/L serta variasi konsentrasi flavonoid 1; 5; 10; 15; dan 20 g/L dan sebagai pengontrol adalah kondisi tanpa penambahan inhibitor. Evaluasi perbedaan kinerja mikroorganisme pada berbagai perlakuan dilakukan berdasarkan nilai-nilai parameter pada model kinetika yang disusun untuk kasus yang dipelajari. Hasil *fitting* model kinetika menunjukkan bahwa keberadaan alkaloid dan flavonoid mengubah pola pertumbuhan produk dari pola pertumbuhan berasosiasi dengan produk (*growth associated product*) menjadi pola campuran (*mixed*) karena produk terbentuk selama pertumbuhan yang lambat dan fase stasioner. Nilai laju pertumbuhan maksimum (μ_m) dan konstanta penghambatan oleh substrat (K_s) yang didapatkan pada masing-masing variasi penambahan inhibitor cenderung tetap dan tidak terpengaruh oleh penambahan konsentrasi inhibitor yakni sebesar 0,69 jam⁻¹ dan 3,89 g/L.

Pada penambahan alkaloid nilai k_d cenderung tetap sampai pada konsentrasi 2 g/L dan mulai naik mulai penambahan 3 g/L sampai 3,5 g/L. k_d merupakan konstanta laju kematian spesifik dan hasil nilai k_d pada berbagai konsentrasi alkaloid menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi alkaloid maka laju kematian bakteri akan semakin cepat. Adapun nilai k_1 yang merupakan koefisien pembentukan produk yang berasosiasi dengan pertumbuhan cenderung berubah seiring dengan penambahan inhibitor. Nilai koefisien pembentukan produk yang tidak berasosiasi dengan pertumbuhan (k_2) 0,02 g g⁻¹ jam⁻¹, konstanta pada persamaan konsumsi glukosa (k_3 dan k_4) yang berturut-turut 3,39 g g⁻¹ dan 0,06 g g⁻¹ jam⁻¹. Nilai k_2 , k_3 , k_4 tersebut cenderung tetap dan tidak terpengaruh oleh penambahan *inhibitor*. Pada penambahan flavonoid nilai k_d cenderung tetap sampai pada konsentrasi 10 g/L dan mulai naik mulai penambahan 15 g/L sampai 20 g/L. Nilai k_2 , k_3 , k_4 cenderung tetap dan tidak terpengaruh oleh penambahan inhibitor. Hasil ini mengindikasikan bahwa konsumsi glukosa oleh bakteri tetap konstan meskipun dengan penambahan *inhibitor*. Model *non-competitive inhibition* dapat menjelaskan fenomena inhibisi dari alkaloid dan flavonoid dimana glukosa tetap terkonsumsi walaupun jumlah mikroba menurun.

Polimerisasi asam laktat menjadi PLA dihasilkan massa molekul tertinggi pada polimerisasi 6 jam sebesar 2835,24 g/mol dengan derajat *Transition glass* 86,65 °C, prosentase *Crystallinity* 53,68%, derajat *Transition melting* 168,43 °C.

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa alkaloid dan flavonoid bersifat *inhibitor* terhadap fermentasi glukosa menjadi asam laktat pada konsentrasi 3 g/L alkaloid dan 15 g/L flavonoid. Kandungan alkaloid dan flavonoid pada hasil hidrolisis dapat dikendalikan dengan mengoptimalkan kondisi pada proses sebelumnya, yaitu delignifikasi dan hidrolisis.

ABSTRACT

Cocoa Pod Husk (CPH) is the biomass waste from cocoa industry, generated after the digestion process. It accounts for about 70-75% of the cocoa fresh fruit. CPH is mainly composed of cellulose, hemicelluloses, lignin and extractive materials. Further characterization of CPH reveals that CPH are composed of 24,51% cellulose, 23,36% hemicellulose, and 30,46% lignin. Cellulose can be converted into lactic acid, a raw material that is widely used in food industry as preservatives in meat, vegetables or canned fish. In the pharmaceutical industry is used as raw material for the manufacture of drugs. Lactic acid in this study was further developed into poly lactic acid (PLA). PLA is an environmentally friendly plastic that is widely used for medical purposes.

The conversion of CPH to PLA is carried out through a series of processes that include delignification to remove lignin, hydrolysis to break cellulose polymers into glucose, fermentation of glucose into lactic acid using microorganisms, and polymerization of lactic acid into PLA. Challenges with complex raw materials such as CPH are the emergence of inhibitor compounds that can disrupt the process of fermentation of glucose into lactic acid.

CPH contains active compounds of alkaloids and flavonoids that are thought to be the inhibitors of the lactic acid fermentation process using microorganisms. This study aims to produce PLA from CPH by studying further the influence of alkaloids and flavonoids on fermentation process using *Lactobacillus plantarum* bacteria. The study included four stages: 1) Determination of sodium hydroxide concentration and relatively precise temperature for the delignification process, 2) Determination of sulfuric acid concentration and relatively precise temperature for acid hydrolysis process and determination of enzyme-CPH concentration and relatively precise temperature for enzyme hydrolysis process, 3) Evaluation of the effects of alkaloids and flavonoids to determine the maximum concentration of alkaloids and flavonoids that can still produce lactic acid without significant inhibitory effects, and 4) PLA characterization

The delignification using sodium hydroxide solution was carried out at room and high temperature to compare its effect on lignocellulosic composition. The results showed that the delignification of CPH with sodium hydroxide solution reached the optimum condition at a concentration of 1.5 M temperature of 220 °C for 10 minutes which caused a decrease in lignin level of 81.73%, hemicellulose 90.81%, and an increase in cellulose level of 91,25%. Alkaloids and flavonoids also decreased significantly by 88.24% and 84.47% compared to the initial content of fresh CPH.

Hydrolysis was carried out by using dilute sulfuric acid and enzyme solutions. Hydrolysis using dilute acid solution reached the optimum condition at 2.0% sulfuric acid concentration, 120 °C and 30 minutes, resulted in the conversion of cellulose to glucose by 9.29%. Hydrolysis using enzyme reached optimum condition at 8% CPH-enzyme ratio, 50 °C and 6 hours, resulted in conversion of cellulose to glucose by 18.41%.

Fermentation using *Lactobacillus plantarum* bacteria was carried out at 50°C and with agitation at 100 rpm in incubator shaker for 48 h. This process was conducted to determine the effect of the addition of alkaloids and flavonoids by analyzing through the comparison between the consumption of substrate (glucose), dry weight of the cell, and the production of lactic acid. The batch fermentation was run with variation of alkaloid concentrations 1; 2; 2.5; 3; and 3.5 g/L and variation of flavonoid concentrations 1; 5; 10; 15; and 20 g/L and as a controller the reactor was run without the addition of any inhibitor. Evaluation of the differences in the performance of microorganisms at various treatments was performed based on the parameters values of the kinetic models prepared for the case studied. The kinetic model fitting results showed that the presence of alkaloids and flavonoids alters the growth patterns of products from growth-associated products into mixed patterns because the products were formed during slow growth and stationary phases. The maximum growth rate (μ_m) and substrate inhibition constant (K_s) obtained on each variation of inhibitor addition were likely to remain constant at the values of 0.69 h⁻¹ and 3.89 g/L respectively, as these parameters were unaffected by the addition of inhibitor.

In the addition of alkaloid the value of k_d remains relatively constant up to a concentration of 2 g/L and increases from the addition of 3 g/L to 3.5 g/L. k_d is the specific death rate constant. The results of k_d values at various concentrations of alkaloids indicate that the higher the concentration of alkaloids the faster the rate of bacterial death. The value of k_1 which is the coefficient of product formation associated with growth tends to change with the addition of inhibitor. The coefficient value of product formation not associated with growth (k_2) 0.02 g g⁻¹ h⁻¹, the constant on the glucose consumption equation (k_3 and k_4) of 3.39 g g⁻¹ and 0.06 g g⁻¹ hour⁻¹. The values of k_2 , k_3 , k_4 are fixed and unaffected by the addition of inhibitor concentration..

In the addition of flavonoids the value of k_d remains relatively up to a concentration of 10 g/L and increases from the addition of 15 g/L to 20 g/L. The values of k_2 , k_3 , k_4 were fixed and were not affected by the addition of the inhibitor concentration. These results provided information that the consumption of glucose by bacteria remains constant despite the addition of inhibitors.

Polymerization of lactic acid into PLA produces the highest molecular mass at 6 hours polymerization of 2835,24 g/mol, degree of transition glass 86,65 °C, Crystallinity percentage 53,68%, degree of transition melting 168,43 °C.

Based on the results of the study it can be concluded that alkaloids and flavonoids are inhibitors in the fermentation of glucose into lactic acid at a concentration of 3 g/L alkaloids and 15 g/L flavonoids. The content of alkaloids and flavonoids in hydrolysis results can be controlled by optimizing conditions in the previous process, on delignification and hydrolysis.