

**KAJIAN DERAJAT BRIX DAN WAKTU FERMENTASI PULPA KAKAO  
(*Theobroma cacao Linn*) TERHADAP TOTAL FENOL, AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN DAN SIFAT SENSORI PADA PEMBUATAN  
KOMBUCHA**

**TESIS**

Oleh

**KARTIKA CANDRA WIBOWO  
NPM 1924051004**



**MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## ABSTRAK

### KAJIAN DERAJAT BRUX DAN WAKTU FERMENTASI PULPA KAKAO (*Theobroma cacao Linn*) TERHADAP TOTAL FENOL, AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SIFAT SENSORI PADA PEMBUATAN KOMBUCHA

Oleh

KARTIKA CANDRA WIBOWO

Kombucha pulpa kakao adalah minuman hasil fermentasi pulpa kakao menggunakan inokulum bakteri dan yeast (SCOBY). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi kadar brix dan waktu fermentasi yang ideal untuk menghasilkan kombucha pulpa kakao dengan total fenol dan aktivitas antioksidan tertinggi serta sensori terbaik. Penelitian ini menggunakan 2-faktorial *Central Composite Design* berdasarkan *Response Surface Methodology*, dengan faktor pertama (P) derajat brix 12 dan 16. Waktu fermentasi faktor kedua (T), dengan pilihan 4, 8, dan 12 hari. Hasil penelitian menyarankan bahwa kombucha yang dibuat dari pulpa kakao dengan derajat brix dan waktu fermentasi yang optimum menghasilkan total fenol tertinggi dan aktivitas antioksidan terbaik serta dengan sensori yang agak disukai.

Kata kunci: antioksidan, fenol, kombucha, pulpa kakao, sensori

## **ABSTRACT**

**STUDY OF THE BRIX LEVEL AND FERMENTATION TIME OF COCOA PULP (*Theobroma cacao Linn*) FOR MAXIMIZING TOTAL PHENOLIC, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND SENSORY PROPERTIES IN KOMBUCHA PRODUCTION**

By

**KARTIKA CANDRA WIBOWO**

Kombucha cacao pulp is a beverage made from fermented cocoa pulp using bacterial and yeast inoculums (SCOBY). The purpose of this research was to identify the ideal brix level and time of fermentation for maximizing the increase of total phenolic, antioxidant activity and sensory properties in kombucha made from cocoa pulp. This research employed a 2-factorial Central Composite Design based on the Response Surface Methodology, with the first factor (P) was brix levels of 12 and 16. Time of fermentation was the second factor (T), with options of 4, 8, and 12 days. The results suggested that kombucha made from cocoa pulp treated with optimum °brix and time of fermentation had the highest total phenol content and the best antioxidant activity with the sensory mostly be like assessment.

Keywords: antioxidant, cacao pulp, kombucha, phenolic, sensory

**KAJIAN DERAJAT BRIX DAN WAKTU FERMENTASI PULPA KAKAO  
(*Theobroma cacao Linn*) TERHADAP TOTAL FENOL, AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN DAN SIFAT SENSORI PADA PEMBUATAN  
KOMBUCHA**

Oleh  
**KARTIKA CANDRA WIBOWO**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
**MAGISTER TEKNOLOGI PERTANIAN**

Pada

Program Studi Magister Teknologi Industri Pertanian  
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

Judul Tesis : **KAJIAN DERAJAT BRIX DAN WAKTU FERMENTASI PULPA KAKAO (*Theobroma cacao* Linn) TERHADAP TOTAL FENOL, AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN SIFAT SENSORI PADA PEMBUATAN KOMBUCHA**

Nama Mahasiswa : **Kartika Candra Wibowo**

Nomor Pokok Mahasiswa : **1924051004**

Program Studi : **Magister Teknologi Industri Pertanian**

Fakultas : **Pertanian**



1. **Komisi Pembimbing**

**Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D**  
NIP 19650725 199203 2 002

**Dr. Ir Siti Nurdjanah, M.Sc.**  
NIP 19620720 198603 2 001

2. **Ketua Program Studi**  
**Magister Teknologi Industri Pertanian**

**Dr. Sri Hidayati, S.T.P., M.P.**  
NIP 19710930 199512 2 001

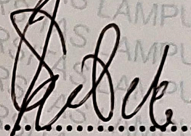
**MENGESAHKAN**

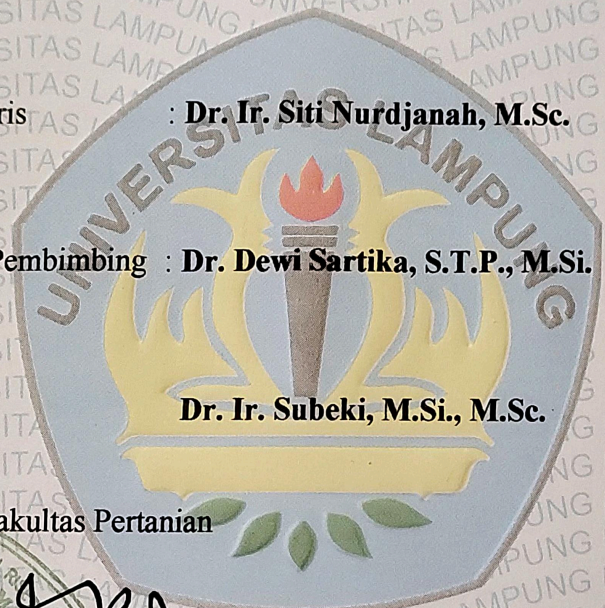
1. Tim Penguji

Ketua : **Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D.** 

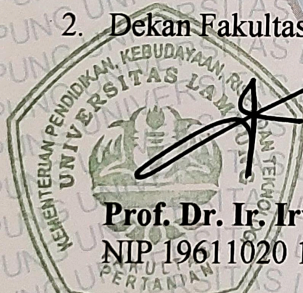
Sekretaris : **Dr. Ir. Siti Nurdjanah, M.Sc.** 

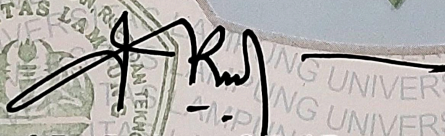
Penguji  
Bukan Pembimbing : **Dr. Dewi Sartika, S.T.P., M.Si.** 

**Dr. Ir. Subeki, M.Si., M.Sc.** 

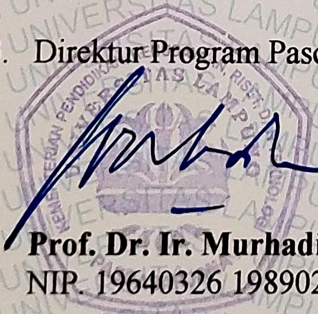



2. Dekan Fakultas Pertanian



  
**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.**  
NIP. 19611020 198603 1 002

3. Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung



  
**Prof. Dr. Ir. Murhadi, M. Si.**  
NIP. 19640326 198902 1 001

Tanggal Lulus Ujian Tesis: **18 April 2023**

## PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya adalah **KARTIKA CANDRA WIBOWO NPM 1924051004**

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil karya saya yang dibimbing oleh Komisi Pembimbing, 1) **Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D.** dan 2) **Dr. Ir. Siti Nurdjanah, M.Sc.** Berdasarkan pada pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini berisi material yang dibuat sendiri dan hasil rujukan beberapa sumber lain (buku, jurnal, dll) yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukanlah hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 18 April 2023

Yang membuat pernyataan



Kartika Candra Wibowo  
NPM 1924051004

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Desa Mengandung Sari, Kecamatan Sekampung Udik, Kabupaten Lampung Timur pada tanggal 01 Oktober 1990 sebagai anak kedua dari empat bersaudara dari pasangan Bapak Agus Wibowo dan Ibu Yustin Mulyowati. Penulis telah menempuh pendidikan formal dimulai pada Tahun 1995 di TK PGRI Jaya Guna, Tahun 1996-2002 di SD Negeri 01 Jaya Guna, Tahun 2002-2005 melanjutkan pendidikan di SMP Negeri 02 Sekampung, kemudian Tahun 2005- 2008 penulis melanjutkan pendidikan di SMA Negeri 01 Sekampung. Tahun 2008 penulis diterima di Perguruan Tinggi Negeri sebagai mahasiswa Program Strata Satu (S1) Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya Malang. Penulis menyelesaikan studi pada bulan Januari 2013. Tahun 2019 penulis memutuskan untuk mengambil Program Pascasarjana (S2) dengan Jurusan Magister Teknologi Industri Pertanian di Universitas Lampung.

Selama mengikuti perkuliahan, penulis menjadi author pada Majalah Teknologi Agro Industri (Tegi) dengan topik “Analisis Peramalan Produksi Dan Konsumsi Daging Ayam Ras Pedaging Di Indonesia Dalam Rangka Mewujudkan Ketahanan Pangan” yang diterbitkan pada Volume 12 No. 2, Desember 2020.



## SANWACANA

*Bismillaahirrahmaanirrahiim.* Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Dalam penulisan tesis ini, penulis banyak mendapatkan bantuan, bimbingan, dan dorongan baik itu langsung maupun tidak langsung dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Ibu Dr. Sri Hidayati, S.TP., M.P., Ketua Program Studi Magister Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
3. Ibu Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D., selaku pembimbing pertama atas kesediaannya untuk memberikan bimbingan, nasihat, saran dan arahan kepada penulis dalam proses penyelesaian tesis ini. Terima kasih juga untuk inspirasi topik penelitian terkait kombucha pulpa kakao ini.
4. Ibu Dr. Ir. Siti Nurdjanah, M.Sc., selaku pembimbing kedua atas kesediaan memberikan bimbingan, saran, arahan dan dukungan kepada penulis dalam proses penyelesaian tesis ini.
5. Ibu Dr. Dewi Sartika, S.T.P., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus sebagai dosen penguji atas segala saran dan nasihat kepada penulis dalam penyelesaian tesis ini.

6. Bapak Dr. Ir. Subeki, M.Si., M.Sc., selaku dosen penguji atas segala saran dan nasihat kepada penulis dalam penyelesaian tesis ini.
7. Bapak dan Ibu dosen yang telah memberikan ilmu dan wawasan kepada penulis selama kuliah.
8. Suamiku tercinta mubaligh Wahyu Dwi Putro, S.Kom., Ibu Yustin Mulyowati, Bapak Agus Wibowo, Mama Nesika Anjasmoro, Omok Zulkarnain dan Kakak Hendrik Eko Putro Wibowo, S.P. dan seluruh keluarga besar yang telah memberikan kasih sayang, doa, dukungan moral dan material.
9. Keluarga MTIP angkatan 2019 serta teman-teman seperjuangan saat penelitian, terima kasih atas segala bantuan, semangat, dukungan, dan kebersamaannya selama ini.
10. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Penulis sangat menyadari tesis ini jauh dari kata sempurna, oleh sebab itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dan dapat memberikan manfaat bagi penulis pribadi dan bagi para pembaca.

Bandar Lampung, 18 April 2023  
Penulis

**Kartika Candra Wibowo**

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>vii</b>
<b>I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang dan Masalah.....	1
1.2 Tujuan .....	3
1.3 Kerangka Pemikiran.....	3
1.4 Hipotesis .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 Kakao .....	5
2.2 Pulpa Kakao .....	6
2.3 Pemanfaatan Pulpa Kakao .....	8
2.4 Kombucha .....	8
2.4.1 Sejarah Kombucha .....	8
2.4.2 Manfaat Kombucha.....	9
2.4.3 Kultur Bakteri dan Yeast (SCOBY) .....	10
2.4.4 Proses Fermentasi .....	11
2.4.5 Senyawa Bioaktif .....	15
2.4.6 Aktivitas Antioksidan Kombucha.....	18

<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
3.1 Tempat dan Waktu .....	20
3.2 Bahan dan Alat.....	20
3.3 Metode Penelitian .....	21
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	22
3.4.1. Penyiapan Pulpa Kakao .....	23
3.4.2 Pembuatan Kombucha Pulpa .....	23
3.4.3 Fermentasi.....	23
3.5 Pengamatan .....	24
3.5.1 Pengujian pH.....	25
3.5.2 Pengujian Total Gula .....	25
3.5.2.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa .....	26
3.5.3 Pengujian Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan .....	26
3.5.3.1 Penyiapan Ekstrak Sampel .....	26
3.5.3.2 Pengujian Total Fenol dan Kurva Standar Asam Galat .....	26
3.5.3.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	27
3.5.3.4 Penentuan IC <sub>50</sub> dan Kurva Baku Asam Askorbat.....	28
3.5.4 Pengujian Warna .....	29
3.5.5 Pengujian Sensori.....	30
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>32</b>
4.1 Derajat Keasaman (pH) .....	32
4.2 Total Gula .....	36
4.3 Total Fenol .....	39

4.4	Aktivitas Antioksidan .....	43
4.5	Warna (nilai $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ), Corak Warna dan Perubahan Warna .....	47
4.6	Sensori.....	57
4.7	Kondisi Optimum.....	66
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>		<b>68</b>
5.1	Kesimpulan .....	68
5.2	Saran .....	68
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>69</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>82</b>

## DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1.	Kandungan nutrisi pulpa kakao .....	7
2.	Regulasi minuman kombucha.....	10
3.	Komponen bioaktif kombucha sebagai antioksidan .....	16
4.	Desain <i>respon surface</i> .....	21
5.	Faktor, variable dan taraf variabel RSM secara factorial $2^2$ pada proses fermentasi kombucha pulpa kakao .....	22
6.	Desain percobaan $2^2$ faktorial dengan 2 variabel bebas.....	22
7.	Kuisisioner uji skoring minuman kombucha pulpa kakao .....	31
8.	Hasil respon pH kombucha.....	32
9.	Hasil respon total gula kombucha.....	36
10.	Hasil respon total fenol kombucha .....	39
11.	Hasil respon aktivitas antioksidan kombucha.....	43
12.	Hasil respon warna kombucha .....	47
13.	Nilai tertinggi pada respon warna berdasarkan model.....	55
14.	Hasil respon sensori kombucha .....	57
15.	Nilai tertinggi pada respon sensori berdasarkan model .....	63
16.	Hasil analisa respon dari saran pertama.....	67
17.	Data hasil analisa pH .....	83

18.	Anova model linier terhadap respon pH.....	83
19.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon pH.....	83
20.	Data hasil analisa total gula .....	84
21.	Anova model linier terhadap respon total gula.....	86
22.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon total gula.....	86
23.	Data hasil analisa total fenol.....	86
24.	Anova model kuadratik terhadap respon total fenol.....	87
25.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon total fenol.....	87
26.	Data hasil analisa aktivitas antioksidan .....	88
27.	Anova model kuadratik terhadap respon aktivitas antioksidan .....	89
28.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon aktivitas antioksidan.....	89
29.	Data hasil analisa warna ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ) .....	89
30.	Anova model 2FI terhadap respon nilai $L^*$ .....	90
31.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon nilai $L^*$ .....	90
32.	Anova model linier terhadap respon nilai $a^*$ .....	91
33.	Nilai parameter pemilihan model terhadap nilai $a^*$ .....	91
34.	Anova model linier terhadap respon nilai $b^*$ .....	91
35.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon nilai $b^*$ .....	91
36.	Data hasil analisa corak warna dan perubahan warna.....	92
37.	Anova model linier terhadap respon corak warna .....	92
38.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon corak warna.....	93
39.	Anova model 2FI terhadap respon perubahan warna.....	93
40.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon perubahan	

	warna .....	93
41.	Data hasil analisa sensori .....	94
42.	Data persentase panelis terhadap analisa aroma .....	95
43.	Data persentase panelis terhadap analisa warna .....	95
44.	Data persentase panelis terhadap analisa rasa.....	96
45.	Data persentase panelis terhadap analisa penerimaan keseluruhan .	96
46.	Anova model linier terhadap respon aroma .....	97
47.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon aroma .....	97
48.	Anova model 2FI terhadap respon warna .....	97
49.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon warna .....	97
50.	Anova model linier terhadap respon rasa.....	98
51.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon rasa.....	98
52.	Anova model 2FI terhadap respon penerimaan keseluruhan.....	98
53.	Nilai parameter pemilihan model terhadap respon penerimaan keseluruhan .....	98
54.	Penampakan warna kombucha pulpa kakao .....	99



## DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1.	Kakao <i>criollo</i> , <i>forastero</i> dan <i>trinitari</i> .....	6
2.	Komposisi buah kakao: a) kulit, b) pulpa, c) plasenta dan d) biji....	6
3.	Pulpa kakao .....	7
4.	SCOBY kombucha dan demonstrasi SCOBY selama fermentasi ...	11
5.	Rute fermentasi kombucha.....	12
6.	Antioksidan sebagai pemberi atom hydrogen.....	19
7.	Antioksidan sebagai prooksidan ... ..	19
8.	Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao.....	24
9.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji pH kombucha.....	34
10.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji total gula kombucha.....	37
11.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji total fenol kombucha.....	40
12.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji aktivitas antioksidan kombucha .....	44
13.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b), uji nilai L* kombucha .....	50

14.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b), uji nilai a* kombucha .....	51
15.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b), uji nilai b* kombucha .....	52
16.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b), uji corak warna kombucha .....	53
17.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b), uji perubahan warna kombucha .....	54
18.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) aroma kombucha.....	59
19.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) warna kombucha .....	60
20.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) rasa kombucha.	61
21.	Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) penerimaan keseluruhan kombucha.....	62
22.	Kombinasi perlakuan optimum derajat brix dan waktu Fermentasi pada kombucha pulpa kakao .....	67
23.	Buah kakao MCC02.....	101
24.	Pengupasan buah kakao .....	101
25.	Pemisahan pulpa dari biji kakao .....	101
26.	Penyaringan cairan pulpa kakao .....	101
27.	Pengukuran brix cairan pulpa .....	101
28.	Stok cairan pulpa kakao .....	101
29.	Kombucha teh dari rumah sehat.....	101

30.	SCOBY dari rumah sehat.....	101
31.	Sterilisasi cairan pulpa kakao .....	102
32.	Pendinginan pulpa kakao .....	102
33.	Penambahan SCOBY .....	102
34.	Fermentasi .....	102
35.	Analisis pH kombucha .....	102
36.	Analisis total gula kombucha.....	102
37.	Analisis total fenol kombucha .....	102
38.	Analisis aktivitas antioksidan kombucha.....	102
39.	Analisis warna.....	103
40.	Analisis sensori .....	103

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang dan Masalah

Kakao (*Theobroma cacao* Linn) merupakan komoditas perkebunan Indonesia yang memberi kontribusi signifikan terhadap devisa negara sebesar 16,6 miliar di tahun 2018; 14,8 miliar di tahun 2019; 16,4 miliar di tahun 2020 dan 16,3 miliar di tahun 2021 (ICCO, 2018; Hartarto, 2019; BPS, 2020; Kemendagri, 2020; Ardika, 2021). Indonesia sebagai negara eksportir terbesar dunia memberikan kontribusi sebesar 2% (Kementan, 2019). Ekspansi perdagangan Indonesia untuk kakao biji ke negara Cina, kakao butter ke negara Cina dan Australia dan bubuk kakao ke negara Rusia (Suryana *et al.*, 2014).

Provinsi Lampung adalah salah satu provinsi penghasil kakao kelima yang produksinya mencapai 54,8 ribu ton pada tahun 2021 (BPS, 2022). Peningkatan produktivitas kakao setiap tahun tersebut akan berbanding lurus dengan peningkatan hasil samping dari pengolahan kakao. Hasil penelitian Chahyaditha (2011) melaporkan bahwa 68,5 % dari berat buah kakao segar terbuang menjadi limbah. Buah kakao mengandung 73,7% kulit, 10,1% pulpa, 2,0% plasenta dan 14,2% biji (Chandrasekaran, 2012 dan Watson, 2012). Pemanfaatan kakao saat ini masih terbatas pada biji dan kulit kakao, sedangkan pulpa kakao belum banyak dimanfaatkan. Kondisi yang banyak terjadi di masyarakat Indonesia adalah hanya membuang pulpa biji kakao ke tanah (Nurfaiillah *et al.*, 2018). Menurut Vasquez *et al.* (2019), pulpa kakao sangat berpotensi untuk diekstraksi menjadi bahan baku dan biotransformasi senyawa penting.

Pulpa merupakan bagian dari buah kakao berwarna putih atau kuning pucat yang menyelimuti permukaan biji kakao dengan berat antara 3- 5 % dari berat total

buah (Murugan dan Al-Sohaibani, 2012; Figueroa *et al.*, 2020; Scheuer, 2020). Pulpa mengandung berbagai senyawa nutrisi, diantaranya 12- 15% gula, 1,5- 2,8% serat, 5- 7% pektin, 0,1- 0,5% protein, 0,2- 0,3% abu serta 80- 90% air (Nurfaillah *et al.*, 2018; Kementan, 2019; Cabosse naturals nv, 2020). Kandungan lain pulpa kakao yakni kalium 1459,842 mg/kg, magnesium 237,230 mg/kg, kalsium 13,343 mg/kg serta memiliki nilai pH 3,5 (Nunes *et al.*, 2020). Komposisi yang demikian menjadikan pulpa cocok untuk digunakan sebagai media fermentasi. Fermentasi pulpa kakao dengan starter simbiosis bakteri- khamir (*SCOBY*) menghasilkan kombucha dengan karakteristik baik (Andrade *et al.*, 2020; Sari, 2022).

Kombucha adalah minuman dari hasil fermentasi menggunakan inokulum yeast dan bakteri yang disebut *SCOBY* (*Symbiotic Culture of Bactery and Yeast*) (Filippis *et al.*, 2018; Leal *et al.*, 2018). Kombucha mengandung vitamin C, B1, B2, B3, B6, dan B12, asam folat, asam organik, glukonat, laktat, glukoronat dan berbagai enzim (Miranda *et al.*, 2016). Komponen bioaktif kombucha memberikan dampak kesehatan diantaranya mampu mengurangi radang sendi, menstabilkan kadar kolesterol, memulihkan pencernaan, penurunan tekanan darah, menurunkan berat badan, penyembuhan penyakit maag, diabetes, asma, kanker prostat dan kanker hati (Mousavi *et al.*, 2020).

Kandungan gula dan waktu fermentasi sangat berpengaruh terhadap peningkatan kandungan senyawa bioaktif pada produk akhir kombucha. Kombucha pulpa kakao dibuat dengan menambahkan air 1: 20 dan 10 % gula pasir kemudian difermentasi selama 12 hari pada suhu kamar (Yuliana *et al.*, 2018). Penelitian Andrade *et al.* (2020), menunjukkan bahwa pulpa kakao madu yang difermentasi selama 2 hari tanpa penambahan gula menghasilkan kombucha dengan total asam 1.12 %. Sedangkan penelitian Sari (2022), menunjukkan bahwa pulpa kakao yang difermentasi selama 8 hari dengan penambahan gula 10% menghasilkan kombucha dengan total asam 6,14%; pH 3,10 dan total padatan terlarut 11°brix.

Senyawa fenolik adalah senyawa bioaktif utama dari kombucha teh (Bortolomei *et al.*, 2022). Senyawa ini merupakan senyawa penting yang berperan sebagai senyawa antioksidan. Penelitian kombucha dari substrat daun teh menunjukkan bahwa penambahan gula 10% dan difermentasi 8 hari menghasilkan aktivitas antioksidan 92,97% dan total fenol sebesar 303,05 µg/ml GAE (Suhardini dan Zubaidah, 2016) dan yang difermentasi 14 hari menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar 82,21% (Lalong, *et al.*, 2022). Penelitian lain juga melaporkan bahwa secang yang difermentasi 10 hari menghasilkan kombucha dengan aktivitas antioksidan terbaik yakni 31,9744 ppm (Pratama, 2022). Perbedaan jenis dan konsentrasi gula serta perbedaan waktu fermentasi pada pembuatan kombucha memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap komponen bioaktif kombucha. Berdasarkan penelitian-penelitian sebelumnya, total fenol dan aktivitas antioksidan serta sifat sensori kombucha yang dibuat dari pulpa kakao belum diteliti sehingga perlu dilakukan penelitian lanjut tentang kajian derajat brix dan waktu fermentasi pulpa kakao (*Theobroma cacao l.*) terhadap total fenol, aktivitas antioksidan dan sifat sensori pada pembuatan kombucha.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan kondisi optimum derajat brix dan waktu fermentasi yang menghasilkan kombucha pulpa kakao dengan total fenol dan aktivitas antioksidan tertinggi serta sifat sensori terbaik.

## **1.3 Kerangka Pemikiran**

Pulpa kakao mengandung glukosa 52,11 g/L dan fruktosa 52,35 g/L (Nunes *et al.*, 2020). Komposisi pulpa kakao tersebut dapat dimanfaatkan sebagai substrat dalam pembuatan minuman kombucha oleh starter simbiosis bakteri-khamir. Keberhasilan pembuatan minuman kombucha dipengaruhi antara lain oleh komposisi media (Marsh *et al.*, 2014), konsentrasi gula (Khamidah dan Antarlina, 2020) dan waktu fermentasi (Wolfe dan Dutton, 2015). Komposisi media dan

konsentrasi gula sangat berpengaruh terhadap kesempurnaan proses fermentasi dan produk akhir yang diharapkan. Hal ini didukung oleh penelitian Sari (2022), yang menyatakan bahwa pulpa kakao yang difermentasi dengan penambahan gula 10 % dapat meningkatkan pertumbuhan mikroba dengan baik sehingga dihasilkan kombucha dengan sifat fisikokimia terbaik.

Waktu fermentasi sangat berpengaruh terhadap produksi metabolit mikroba seperti konsentrasi dan jenis nutrisi serta aroma pada kombucha. Jika fermentasi terlalu cepat, maka keaktifan enzim yang dihasilkan mikroba belum mencapai maksimum sehingga tidak menghasilkan komponen yang dapat menimbulkan reaksi penting. Soares *et al.* (2021) menyatakan bahwa kombucha dengan bahan baku sama tetapi diproses dengan waktu fermentasi berbeda akan menghasilkan komponen bioaktif yang berbeda- beda pada produk akhirnya. Selaras dengan penelitian Muhialdin *et al.* (2019), yang menunjukkan bahwa teh yang difermentasi 14 hari menghasilkan kombucha terbaik dengan aktivitas antioksidan sebesar  $49.265 \pm 4.575$  % dan total fenol sebesar  $13.460 \pm 0.690$  mgGAE/ml. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa secang yang difermentasi 10 hari menghasilkan kombucha dengan aktivitas antioksidan terbaik yakni 31,9744 ppm (Pratama, 2022). Berdasarkan penelitian- penelitian yang sudah dilakukan, diduga waktu fermentasi dan derajat brix dapat memberikan interaksi yang menghasilkan kondisi optimum kombucha pulpa kakao yang memiliki total fenol dan aktivitas antioksidan tertinggi serta sifat sensori terbaik.

#### **1.4 Hipotesis**

Terdapat kondisi optimum derajat brix dan waktu fermentasi yang menghasilkan kombucha pulpa kakao dengan total fenol dan aktivitas antioksidan tertinggi serta sifat sensori terbaik.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kakao

Menurut Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia (2012), klasifikasi tanaman kakao adalah sebagai berikut:

Filum	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: Theobroma
Spesies	: Theobroma cacao L.

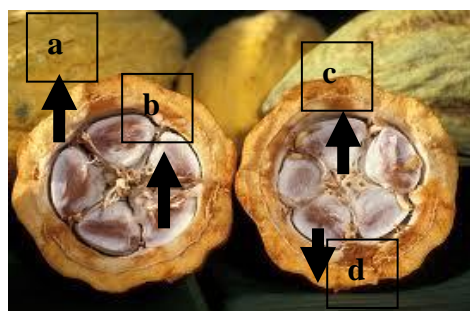
Tanaman kakao yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah kakao “mulia” dan “lindak”. Kakao “mulia” adalah jenis *criollo* dengan cita rasa dan aromanya enak. Kakao “lindak” merupakan jenis *forastero* dengan cita rasa dan aroma kurang enak (Rahardjo, 2011). Menurut Adabe dan Ngo-Samnack (2014), tanaman kakao terdiri dari 3 varietas utama yaitu *Forastero* dengan warna kulit buah kuning-merah, *Criollo* dengan warna kulit buah merah atau merah- orange dan *Trinitario* yaitu persilangan dari dua varietas sebelumnya. *Trinitario* mempunyai rasa kakao special dan warna biji beragam, kadang berwarna putih (Afoakwa, 2016). Perbedaan dari ketiga jenis kakao tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.





Gambar 1. Kakao *criollo*, *forastero* dan *trinitari*  
Sumber: JACRA (2022)

Menurut Chandrasekaran (2012) dan Watson *et al.* (2012), buah kakao terdiri dari empat bagian yaitu 73,7% kulit, 10,1% pulpa, 2,0% plasenta dan 14,2% biji. Komposisi dari buah kakao dijelaskan pada Gambar 2. Biji kakao dibedakan menjadi dua bagian yaitu bagian yang tidak dapat dimakan yakni cangkang dan bagian yang dapat dimakan yakni biji (Adabe dan Ngo-Samnick, 2014). Pengolahan buah kakao dibagi menjadi 2 yaitu pengolahan produk utama dari biji kakao dan hasil samping. Biji kakao dikeringkan dan diolah menjadi produk-produk olahan coklat setengah jadi atau produk siap konsumsi (Fahrurrozi *et al.*, 2020). Sedangkan hasil samping buah kakao adalah kulit kakao dan pulpa kakao.

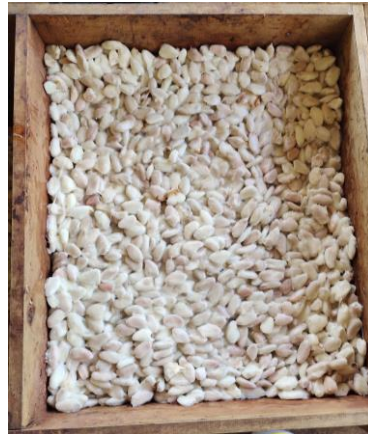


Gambar 2. Komposisi buah kakao: a) kulit, b) pulpa, c) plasenta dan d) biji.  
Sumber: Dokumentasi pribadi

## 2.2 Pulpa Kakao

Pulpa kakao merupakan bagian dari buah kakao berwarna putih atau kuning pucat yang menyelimuti permukaan biji kakao dengan berat antara 3- 5 % dari berat

total buah. Penampakan pulpa kakao ditunjukkan pada Gambar 3. Adapun kandungan nutrisi pulpa kakao disajikan pada Tabel 1.



Gambar 3. Pulpa kakao

Sumber: Dokumentasi pribadi

Tabel 1. Kandungan nutrisi pulpa kakao

No	Parameter	Pulpa Kakao	Jus Pulpa Kakao	Sumber
1	Gula (%)	10- 14*	10- 18**	*Murugan dan Al-Sohaibani (2012); Figueroa <i>et al.</i> (2020) dan Scheuer (2020) **Pothakos <i>et al.</i> (2016)
2	Karbohidrat (%)	-	4,10	Afolabi <i>at al.</i> (2015)
3	Serat kasar (%)	-	0,47	
4	Protein (%)	-	0,53	
5	Lemak (%)	-	1,00	
6	Besi (mg)	-	1,22	
7	Fosfor (mg)	-	30	
8	TPT (%)	-	11,47	
9	Vitamin C (mgA.A)	-	12	
10	Fenol (mg GAE/100gr)	103,76	-	Endraiyani <i>et al.</i> (2016)
11	pH	3,5*	3,87**	*Nunes <i>et al.</i> (2020)
12	Kalsium (mg/kg)	13,343*	24**	** Afolabi <i>at al.</i> (2015)
13	Kalium (mg/kg)	1459,842	-	
14	Glukosa (g/L)	52,11	-	Nunes <i>et al.</i> (2020)
15	Fruktosa (g/L)	52,35	-	
16	Magnesium (mg/kg)	237,230	-	

## 2.3 Pemanfaatan Pulpa Kakao

Pulpa kaya karbohidrat yang merupakan substrat untuk fermentasi mikroba sehingga sangat cocok digunakan sebagai media fermentasi (Pothakos *et al.*, 2016). Fermentasi dari pulpa kakao terjadi secara alami dengan bantuan yeast sehingga dapat menghasilkan berbagai produk. Produk- produk pangan dari pengolahan pulpa kakao seperti cuka, alkohol, *soft drink*, jelly, asam sitrat, nata de kakao, marmalade, ethanol, wine, *beer*, pektin, selai dan jus pulpa kakao (Oddoye *et al.*, 2013; Towaha, 2013; Figueroa *et al.*; 2020 dan Nunes *et al.*; 2020). Selain itu pulpa kakao juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan pembuatan biogas, biohidrogen, bioethanol, bioherbisida gulma belulang dan aktivator pengompos (Balittri, 2016; Safitri, 2019; Mendoza-Meneses, 2021).

Perkembangan penelitian dilakukan oleh Andrade *et al.* (2020) menunjukkan bahwa kombucha dapat diproduksi dari pulpa kakao madu yang difermentasi 2 hari tanpa adanya penambahan gula. Sedangkan penelitian lain oleh Sari (2022) melaporkan bahwa kombucha dapat diproduksi dari pulpa kakao yang difermentasi 8 hari dengan penambahan gula 10 %. Rasa dan aroma pada pulpa kakao yang difermentasi dapat ditingkatkan dengan penambahan jahe (Ninda, 2022) dan kayumanis (Syari, 2022).

## 2.4 Kombucha

### 2.4.1 Sejarah Kombucha

Kombucha adalah minuman tradisional berasal dari timur laut Tiongkok pada masa Dinasti Tsin 220 SM (Zou *et al.*, 2021). Kombucha berasal dari kata “*kombu*” dan “*cha*” yang berarti “rumput laut” dan “teh”. Kombucha mulai dikenal setelah dibawa ke Jepang dan menyebar ke seluruh dunia melalui jalur perdagangan (Abaci *et al.*, 2022). Kombucha diproduksi melalui fermentasi ekstrak teh yang dikombinasikan dengan sukrosa dan kultur starter yang terdiri dari berbagai kultur simbiosis bakteri dan *yeast* (Frias *et al.*, 2017).

Kombucha saat ini menjadi tren minuman fungsional yang mempunyai klaim fungsional (Junior *et al.*, 2022). Inovasi kombucha terus dilakukan untuk meningkatkan cita rasa dan fungsi minuman baik dengan rempah, buah- buahan, sayuran, susu dan bahan agroindustri (Emiljanowicz dan Malinowska-Panczyk, 2019; Leonarski, 2022). Menurut Yuliana *et al.* (2018), kombucha pulpa kakao dibuat dari cairan pulpa kakao yang diencerkan dengan menambahkan air pada perbandingan 1: 20. Proses selanjutnya yaitu menambahkan 10% gula pasir dan disterilisasi selama 10 menit. Pulpa kakao setelah dingin siap dijadikan media fermentasi dengan menambahkan starter kombucha yang kemudian difermentasi selama 8- 12 hari. Pemanenan kombucha diawali dengan mempasteurisasi kombucha pada suhu 70- 80°C selama 10 menit untuk menghentikan proses fermentasi.

#### **2.4.2 Manfaat Kombucha**

Dilansir dari berbagai hasil penelitian yang telah dilaporkan menunjukkan bahwa mengkonsumsi kombucha memberikan efek menguntungkan bagi tubuh. Adapun manfaat mengkonsumsi kombucha antara lain memiliki sifat antibiotik, aktivitas lambung, aktivitas usus dan kelenjar, melegakan sendi rematik, asam urat dan wasir, menurunkan kolesterol, arteriosklerosis, ekskresi toksin dan pembersihan darah, diabetes, mengatasi gugup dan masalah penuaan (Endraiyani *et al.*, 2016). Manfaat diatas dikarenakan kombucha mengandung vitamin C, B1, B2, B3, B6, dan B12, asam folat, asam organik, asam glukonat, l-laktat, dan glukoronat serta berbagai enzim. Senyawa bioaktif pada kombucha tersebut akan meningkat keberadaannya setelah proses fermentasi (Miranda *et al.*, 2016).

Aturan konsumsi kombucha menurut Center for Disease Control (2020) bagi individu normal yaitu 110 ml per hari. Berbagai manfaat telah diuji dan dikonfirmasi melalui percobaan *in vitro* maupun secara *in vivo* pada hewan coba, tetapi masih belum ada bukti klinis untuk aktivitas biologis kombucha pada manusia. Efek toksik terkait dengan konsumsi kombucha memerlukan penyelidikan dan studi lebih lanjut sehingga tidak direkomendasikan untuk

individu dengan riwayat penyakit yang sudah ada sebelumnya, wanita hamil, ibu menyusui dan anak-anak di bawah usia 4 tahun (Miranda *et al.*, 2021). Adapun regulasi minuman kombucha pada Tabel 2.

Tabel 2. Regulasi minuman kombucha

No	Parameter	Minimal	Maksimal
1	pH	2,5* Tidak $\leq$ 2,5** 2,2***	4,2* 3,8***
2	Tanpa alkohol (%)	-	0,5*
3	Dengan alkohol (%)	0,6*	0,8* Tidak $\geq$ 1**
4	<i>Volatile acidity</i> (mEq/L)	30*	130*
5	Tekanan (atm 20°C) dalam kombucha yang ditambah dengan CO <sub>2</sub>	1,1*	3,9*
6	Asam asetat (%)	0,27***	2,03***
7	Arsenik (As) (mg/kg)	-	0,05***
8	Timah (Pb) (mg/kg)	-	0,05***
9	Mercuri (Hg) (mg/kg)	-	0,001***
10	Kadmium (Cd) (mg/kg)	-	0,003***

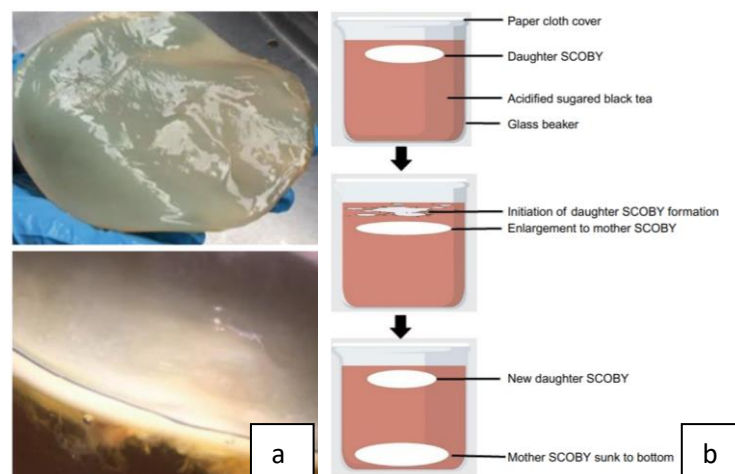
Sumber: \* Brasil (2019), \*\* Center of Disease Control (2020), \*\*\*Kombucha Brewers International (2021).

### 2.4.3 Kultur Bakteri dan Yeast (SCOBY)

Kultur simbiosis bakteri dan *yeast* (SCOBY) berbentuk spons selulosa dan dikenal sebagai “jamur teh”. Rasa kombucha ketika baru disiapkan seperti sari apel yang manis dan akan berubah seperti cuka seiring dengan lama fermentasi yang terjadi. Strain bakteri yang diidentifikasi pada SCOBY adalah *Acetobacter sp.*, *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter pasteurianus*, *Komagataeibacter xylinus*, *Gluconacetobacter xylinus*, *Gluconobacter oxydans*, *Allobaculum sp*, *Bifidobacterium sp*, *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Propionibacterium sp.*, *Ruminococcaceae Incerate Sedis*. Golongan *yeast* yaitu *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Brettanomyces*

*sp.*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces intermedius*, *Candida sp.*, *Candida formata*, *Pichia sp.*, *Pichia membranaefaciens*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Torula*, *Torulaspota delbrueckii*, dan *Torulopsis sp.* (Soares *et al.*, 2021; Bishop *et al.*, 2022; Zailani dan Adnan, 2022).

Kultur yang digunakan harus produktif yang ditandai dengan warna lebih cerah dan tidak rapuh ketika dipegang. Kultur yang tidak produktif berwarna coklat tua atau setelah melakukan fermentasi sekitar 5-7 kali (Simanjuntak, 2017). Penampakan dari SCOBY kombucha dan demonstrasinya dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. a) SCOBY kombucha dan b) demonstrasi SCOBY selama fermentasi.

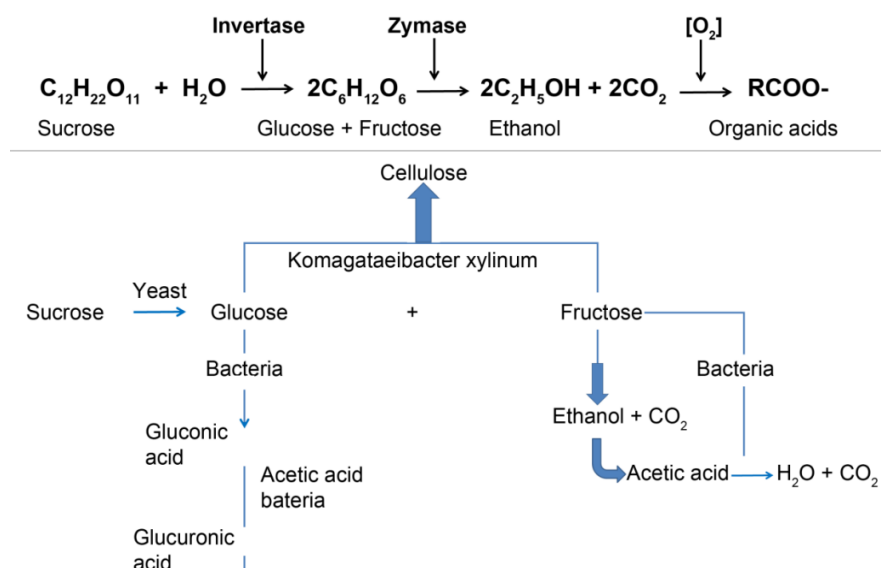
Sumber: a) Dutta dan Paul (2019); b) Mousavi *et al.*(2020)

#### 2.4.4 Proses Fermentasi

Fermentasi merupakan pengolahan makanan secara tradisional baik skala rumah tangga hingga tingkat industri. Makanan fermentasi didefinisikan sebagai konversi metabolik substrat mentah menjadi makanan dengan peningkatan kualitas atau proses yang memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroba untuk stabilisasi dan transformasi bahan pangan layak konsumsi dengan nilai produk yang

ditingkatkan. Hasil akhir proses fermentasi berupa metabolit antimikroba, produksi bakteriosin dan sintesis asam organik menghambat patogen. Tujuan fermentasi adalah meningkatkan umur simpan produk, peningkatan manfaat kesehatan, meningkatkan karakteristik organoleptik (aroma, rasa dan tekstur) serta menghambat mikroba yang tidak diinginkan dan menghilangkan toksisitas dari makanan dan siap untuk dikonsumsi (Sankaranarayanan *et al.*, 2020).

Proses fermentasi kombucha terjadi karena adanya sukrosa dan substrat yang dimanfaatkan oleh mikroba sebagai sumber karbon dan nutrisi. Sukrosa akan dihidrolisis oleh *yeast* melalui invertase dalam kondisi anaerob menjadi fruktosa dan glukosa. *Yeast* bertindak lebih lanjut mengubah glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida. Kemudian *Lactobacillus* mengubah glukosa menjadi asam laktat. Sedangkan, *Acetobacteria* dalam kondisi aerob mengubah etanol menjadi asam asetat dan air. Rute fermentasi utama kombucha akan menghasilkan produk berupa etanol, asam asetat, asam glukonat dan asam glukoronat (Jakubczyk *et al.*, 2022; Zailani dan Adnan, 2022). Aktivitas metabolisme kombucha ditunjukkan secara skematis pada Gambar 5.



Gambar 5. Rute fermentasi kombucha

Sumber: Massoud *et al.*(2022)

Produk akhir dari setiap proses fermentasi tidak akan sama. Perbedaan hasil fermentasi dari substrat yang sama dipengaruhi oleh variasi bahan seperti wadah fermentasi, *Lactobacilli*, garam, bumbu dan rempah, starter atau kultur, gula dan waktu (Jeanroy dan Wasserman, 2019). Faktor- faktor yang mempengaruhi fermentasi kombucha adalah

a. Substrat

Kombucha dapat dibuat dari berbagai substrat seperti teh hijau, teh hitam, teh oolong, ekstrak umbi, anggur, susu, jus buah dan infus tanaman. Kombucha dari substrat teh harus dimaniskan dengan menambahkan sukrosa 50gr/L air sebagai substrat fermentasi *yeast*. *Yeast* akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa menggunakan enzim invertase dan akan diubah lagi menjadi etanol, karbon dioksida, dan gliserol. Etanol yang terbentuk oleh bakteri asam asetat akan diubah menjadi asam asetat (Bishop *et al.*, 2022).

b. Starter

Penggunaan kultur starter menjadikan proses produksi jauh lebih efisien, hasil produk lebih tinggi dan sifat organoleptik produk yang konsistensi. Sebagian besar karakteristik fermentasi tergantung pada jenis mikroorganisme yang ada (Sun *et al.*, 2014). Mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi adalah golongan bakteri dan *yeast* yang bekerja secara simbiotik; seperti halnya golongan *Acetobacter* yaitu *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Brettanomyces sp.*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Torulopsis sp.*, *Zygosaccharomyces bailii*; *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Candida* (Watawana *et al.*, 2015; Suhardini dan Zubaidah, 2016).

c. Gula

Gula digunakan mikroorganisme sebagai sumber energi selama fermentasi dan membentuk lapisan selulosa (Pothakos *et al.*, 2016). Penggunaan gula dengan konsentrasi yang berbeda akan berbeda pada produk akhir yang dihasilkan. Penelitian Handoko, (2020) melaporkan bahwa kombucha teh herbal buah mangrove dengan penambahan gula 10% dan difermentasi 14 hari menghasilkan fenolik total 19.679,82 mg GAE /100g dan IC50 sebesar 33,95 ppm serta sensori yang disukai daripada dengan penambahan gula 20% dan



30%. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa jus murbei pada berbagai derajat brix menghasilkan total fenol berbeda, dimana jus murbei 14 °brix dan difermentasi 48 jam menghasilkan total fenol tertinggi sebesar  $928,12 \pm 3,05$  mg/100 ml (Kwaw *et al.*, 2017).

d. Waktu Fermentasi

Waktu fermentasi akan berdampak pada produksi metabolit, jenis dan konsentrasi nutrisi serta aroma. Fermentasi kombucha selama 6 - 10 hari akan menghasilkan minuman yang menyegarkan, akan tetapi fermentasi lebih dari 10 hari menghasilkan minuman yang tidak enak dan asam organik yang berbahaya meskipun konsentrasinya lebih tinggi (Bishop *et al.*, 2022). Hassmy *et al.* (2017), kombucha teh hijau yang difermentasi 1 hari sampai 5 hari menghasilkan pH dan antioksidan yang aman dikonsumsi. Penelitian Zofia *et al.* (2020) membuktikan bahwa kombucha kopi biji hijau yang difermentasi selama 14 hari mempunyai aktivitas antioksidan SOD yang lebih tinggi sehingga berfungsi sebagai anti-ageing dari pada yang difermentasi selama 28 hari hanya meningkatkan total fenol dan total flavonoid.

e. Suhu

Mikroba dan bakteri memiliki suhu minimal, maksimal dan optimal untuk pertumbuhannya (Cheng *et al.*, 2016). Suhu optimal fermentasi diperlukan untuk mencapai kondisi ideal mikroba dan aktivitas enzimatis selama proses fermentasi sehingga menghasilkan produk terbaik (Hur *et al.*, 2014). Suhu ideal untuk fermentasi kombucha berkisar antara 22°C - 30°C (Vitas *et al.*, 2013). Suhu fermentasi yang terlalu tinggi akan meningkatkan konsentrasi etanol dan asam asetat sehingga tidak dapat dikonsumsi (Crum dan Lagory, 2016).

f. pH

Selama proses fermentasi kombucha, pH berpengaruh terhadap laju pertumbuhan mikroba dan perubahan struktural fitokimia yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan (Hur *et al.*, 2014). Bakteri memerlukan pH 3,5- 5,5 untuk dapat tumbuh dengan baik (Ganjar dan Samsul, 2016).

Ketika titrasi keasaman mencapai konsentrasi optimal dari 4- 5 g/L maka proses fermentasi harus dihentikan (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

g. Sanitasi

Sanitasi peralatan kaca maupun *stainless steel* dan lingkungan fermentasi kombucha sangat penting untuk menghindari terjadinya fermentasi yang buruk (Leal *et al.*, 2018). Sanitasi juga bertujuan mencegah pertumbuhan bakteri berbahaya. Adapun upaya sanitasi yang dilakukan seperti pasteurisasi, pendinginan dan penggunaan pengawet . Natrium benzoat dan kalium benzoat digunakan oleh industri untuk mencegah *yeast* dan bakteri memproduksi alkohol dan karbon dioksida setelah proses pengemasan (Watawana *et al.*, 2015).

h. Air

Air dalam proses fermentasi harus bebas kontaminasi. Air berdampak pada rasa kombucha dan kondisi SCOBY selama proses fermentasi. Air sebagai media pertumbuhan awal *yeast* dan bakteri sebelum dimulainya proses fermentasi tergantung pada sumber dan lokasi air seperti air sumur, mata air atau air kota serta mineral dan komposisi organik air (Crum dan Lagory, 2016; Tran *et al.*, 2020). Air sumur tidak diolah dengan klorin atau fluorida sehingga mengandung mineral seperti bikarbonat, besi, dan magnesium yang dapat berdampak negatif pada rasa kombucha. Air kota diolah dengan klorin atau fluorida agar aman untuk diminum dan karena sifat antimikroba. Penggunaan air ini mengganggu kemampuan SCOBY untuk memfermentasi dan menghasilkan senyawa rasa sehingga perlu menerapkan sistem penyaringan menggunakan karbon aktif. lampu UV untuk mendisinfeksi air mencegah kontaminasi (Palmer, 2013; Crum dan Lagory, 2016).

#### 2.4.5 Senyawa Bioaktif

Komponen bioaktif merupakan molekul kecil yang dihasilkan dari perubahan kimia selama proses fermentasi dan memberikan tindakan biologis. Produksi senyawa bioaktif berbeda- beda tergantung pada varietas atau kultivar tanaman (Frias *et al.*, 2017) dan mikroorganisme yang digunakan (Antolak *et al.*, 2021).

Komponen bioaktif kombucha yang berasal dari tanaman berupa senyawa fenolik, polisakarida, vitamin, mineral, asam amino. Sedangkan yang berasal dari metabolik mikroorganisme yaitu polifenol, vitamin B dan C biosintesis, asam asetat, asam glucuronik, *D-saccharic acid 1,4 lactone* (DSL), etanol, asam amino, asam laktat, probiotik, bioaktif peptide dan bakteriosin (Antolak *et al.*, 2021).

Komponen bioaktif sangat dibutuhkan tubuh manusia selama hidup, baik dengan melakukan perbaikan, pemulihan atau regenerasi sel (Tyassuma, 2018). Bioaktivitas kombucha yaitu sebagai antimikroba, anti kanker atau sitotoksik, anti inflamasi, antioksidan, hepatoprotektif, anti penuaan, anti hipertensi, perlindungan saraf, penyembuhan luka, anti diabetes, anti hiperkolesterolemia, efek probiotik, detok dan terapi (Watawana *et al.*, 2015; Tyassuma, 2018; Abaci *et al.*, 2022). Adapun komponen bioaktif kombucha sebagai antioksidan dari berbagai substrat ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Komponen bioaktif kombucha sebagai antioksidan

<b>Substrat</b>	<b>Gula (b/v)</b>	<b>Kultur Starter</b>	<b>Waktu &amp; Suhu Fermentasi</b>	<b>Komponen Bioaktif</b>	<b>Referensi</b>
Daun kopi robusta, jambu biji, sirsak, salam, teh dan sirih (3-5 lembar / 400ml)	10%	Starter kombucha cair 30 ml dan nata SCOBY	0, 8 dan 14 hari pada 25°C	Kombucha terbaik dihasilkan dari substrat daun teh (0.23%) yang difermentasi 8 hari didapatkan kombucha dengan total asam 0.09%, aktivitas antioksidan 92.97% dan total fenol sebesar 303.05 µg/ml GAE.	Suhardini dan Zubaidah (2016)
Buah salak berbagai varietas (Suwaru, Madura, Pondoh dan Bali) sebanyak	10%	Starter komersial kombucha 10%	0 dan 14 hari pada 28 ± 3°C	Kombucha dari semua substrat efektif sebagai anti-diabetes pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin. Kandungan asam organik dan polifenol kombucha salak suwaru menurunkan	Zubaidah <i>et al.</i> (2018)

Substrat	Gula (b/v)	Kultur Starter	Waktu & Suhu Fermentasi	Komponen Bioaktif	Referensi
500gr/ 500ml				kadar glukosa darah secara signifikan; peningkatan sel pankreas; MDA rendah dan tingkat SOD tinggi dan peningkatan profil lipid dengan kolesterol LDL rendah, tingkat TG, TC dan kolesterol HDL tinggi.	
Buah salak Suwaru, Madura, Pondoh dan Bali (500gr/500ml)	10%	Starter komersial kombucha 10%	0 dan 14 hari pada $\pm 3^{\circ}\text{C}$	Kombucha terbaik terbuat dari substrat salak Suwaru dimana nilai total fenol 535.59 mg/L GAE dan aktivitas antioksidannya 88.18% pada fermentasi 14 hari.	Zubaidah <i>et al.</i> (2019)
Daun teh hitam dan daun kopi Arabika (4gr/ L)	10%	Starter kombucha cair 10%	0 dan 10 hari pada $\pm 3^{\circ}\text{C}$	Kombucha teh hitam menunjukkan senyawa fenolik dan asam organik berkontribusi signifikan sebagai agen imunomodulator pada tikus yang terinfeksi oleh <i>S. typhi</i> .	Zubaidah <i>et al.</i> (2021)
Teh (hijau, hitam dan Echinacea) dan susu (kambing, sapi dan kedelai) sebanyak 4 gr/ L	10%	Kultur kombucha 3% (b/v) (3gr)	Teh (0, 3 dan 9 hari) dan Susu (0 dan 6 hari) pada $25^{\circ}\text{C}$	Kombucha teh hijau terbaik dari fermentasi 9 hari dengan kadar fenol $472,09 \pm 4,94 \mu\text{gGAE ml}^{-1}$ dan antioksidan $1.29 \pm 0.00 \text{ mol Trolox g ekstrak}^{-1}$ . Kombucha susu kambing terbaik dari fermentasi 6 hari dengan kadar fenol $1334,43 \pm 3,88 \text{ A } \mu\text{gGAE ml}^{-1}$ dan antioksidan $2.06 \pm 0.031 \text{ mol Trolox g ekstrak}^{-1}$ .	Ozyurt (2020)

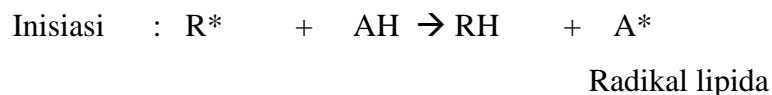
#### 2.4.6 Aktivitas Antioksidan Kombucha

Antioksidan merupakan molekul yang mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh oksidasi molekul lain dengan mematikan radikal bebas (Siagian, 2012; Mamta *et al.*, 2013). Antioksidan berdasarkan sumbernya dibedakan menjadi antioksidan alami dan sintesis. Antioksidan alami berasal dari metabolisme tubuh manusia atau sumber alami lainnya. Kelompok antioksidan alami yakni antioksidan enzimatis seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathion reduktase (GR) dan glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PDH). Antioksidan non enzimatis seperti mineral (Fe, Mg, Se, Cu), vitamin (A, C, E), karotenoid, polifenol, protein pengikat logam transisi (albumin, seruloplasmin, hepatoglobin, transferrin), dan antioksidan non protein (bilirubin, asam urat, koenzim ). Antioksidan sintesis yaitu antioksidan yang diproduksi secara artifisial dengan berbagai teknik. Antioksidan golongan ini seperti BHA, BHT, EDTA, Etoksikuin, PG dan TBHQ (Siagian, 2012; Mamta *et al.*, 2013).

Menurut Kaur *et al.* (2021), antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya dibedakan menjadi tiga jenis. Pertama, antioksidan yang mencegah pembentukan radikal bebas seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathione peroxidase (GPX). Kedua, antioksidan yang menangkap radikal bebas dan termasuk antioksidan metabolik seperti asam lipoat, glutathion, l-arginine, histidin, koenzim Q, melatonin, asam urat, albumin, bilirubin, protein pengikat logam, transferin, vitamin E, vitamin C, flavonoid, karotenoid, logam (selenium, mangan, seng), asam lemak omega 3 dan omega 6. Ketiga, enzim antioksidan yang terlibat dalam mekanisme perbaikan kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas seperti lipase, transferase, protease, enzim perbaikan DNA dan reduktase metionin-sulfoksida (Kaur *et al.*, 2021).

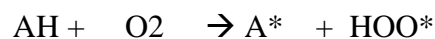
Antioksidan dapat memperlambat ataupun mencegah oksidasi yang menyebabkan stres oksidatif dan merusak sel-sel tubuh. Antioksidan bekerja dengan pemberi atom hydrogen dan memperlambat laju autooksidasi. Antioksidan (AH) sebagai

pemberi atom hydrogen (antioksidan primer) akan memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ( $R^*$ ,  $ROO^*$ ) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan ( $A^*$ ) memiliki keadaan lebih stabil. Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan ( $A^*$ ) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru seperti pada Gambar 6. Cara kerja antioksidan lainnya adalah mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil mampu memperlambat laju autooksidasi. Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan pada Gambar 7 (Sanchez, 2019).



Gambar 6. Antioksidan sebagai pemberi atom hydrogen

Sumber: Sanchez (2019)



Gambar 7. Antioksidan sebagai prooksidan

Sumber: Sanchez (2019)

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian dan Laboratorium Rekayasa Bioproses dan Pasca Panen, Jurusan Teknik Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2022 sampai dengan Januari 2023.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah pulpa buah kakao segar varietas Makasar MCC02 (*Trinitario*) yang diperoleh dari petani yang ada di desa Kota Dalam kecamatan Way Lima Pesawaran, desa Suka Agung kecamatan Bulok Tanggamus dan desa Umbul Karet Banjar Agung Lampung Timur. Starter SCOBY komersial diperoleh dari Rumahku Sehat di Bekasi. Bahan yang digunakan untuk analisa adalah larutan DPPH, reagen *Folin-ciocalteu* 50%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2%, akuades, fenol 5%, asam sulfat pekat, etanol p.a 96%, asam galat, asam askorbat dan glukosa.

Alat yang digunakan dalam pembuatan kombucha adalah seperangkat alat kaca, *refractometer* (ATC), timbangan analitik, thermometer, pH meter (ADWA) dan lemari fermentasi. Alat yang digunakan untuk analisa adalah pH meter (ADWA), spektrofotometer UV-visibel (Shimadzu), *orbital shaker* (HS 50 1 digital IKA WERKE), timbangan analitik, *centrifuge* (Gemmy PLC-03 8 HOLE) dan *color meter portable* (Tongbao TES- 135A).

### 3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode RSM (*Response Surface Methodology*) yang diterapkan pada fermentasi kombucha dengan derajat brix dan waktu fermentasi berbeda. Rancangan design pada metode RSM adalah *Central Composite Design* yang terdiri dari 2 faktorial, yaitu faktor pertama (P) derajat brix dengan nilai 12 °brix (P1) dan 16 °brix (P2). Faktor kedua (T) waktu fermentasi hari ke-4 (T1), hari ke-8 (T2) dan hari ke-12 (T3).

Parameter penelitian yang diamati pada penelitian ini adalah pH, total gula, total fenol, aktivitas antioksidan, warna dan sensori. Percobaan ini menggunakan 2 variabel independen atau variable bebas sehingga nilai rotabilitasnya ( $\alpha$ ) = 1,414 dan *Central Composite Design* menghasilkan *response surface*. *Response surface* menunjukkan jumlah rancangan percobaan 13 faktorial, 5 *center point* dan 4 *axial point* (Tabel 4). Hasil variabel respon selanjutnya dianalisis sidik ragamnya menggunakan program Design Expert 12 (Raissi dan Farzani, 2009). Kecocokan dan kesesuaian model diuji dengan ANOVA.

Tabel 4. Desain Respon Surface

<b>Central Composite Design</b>	<b>Total</b>		<b>Total</b>
Faktor	2	Replicates	1
Base runs	13	Total runs	13
Base blocks	1	Total blocks	1
<b>Two-level factorial Full factorial</b>			
Cube points	4		
Center points in cube	5		
Axial points	4		
Center points in axial	0		
<b><math>\alpha</math>: 1,414</b>			



Tabel 5. Faktor, variabel, dan taraf variabel RSM secara faktorial  $2^2$  pada proses fermentasi kombucha pulpa kakao

No	Faktor	Variabel	Taraf Variabel				
			$-\alpha$ -1,414	Rendah -1	Tengah 0	Tinggi +1	$+\alpha$ +1,414
1	Derajat Brix ( $^{\circ}$ brix) (b/v)	A	11	12	14	16	17
2	Waktu Fermentasi (hari)	B	2	4	8	12	14

$k$  = jumlah faktor atau variabel bebas  $\pm \alpha$  1,414 = X – nilai tengah/ selisih taraf

Tabel 6. Desain percobaan  $2^2$  faktorial dengan 2 variabel bebas

Running	Faktor 1 Derajat Brix ( $^{\circ}$ brix)	Faktor 2 Waktu Fermentasi (Hari)
1	14	8
2	14	8
3	12	12
4	14	2
5	16	4
6	14	8
7	14	8
8	17	8
9	14	14
10	14	8
11	11	8
12	16	12
13	12	4

Keterangan:

F1 : Derajat brix

F2 : Waktu Fermentasi

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dibagi menjadi 3 tahapan yaitu penyiapan pulpa kakao, pembuatan kombucha dan fermentasi. Prosedur masing- masing tahapan sebagai berikut:

### 3.4.1 Penyiapan Pulpa Kakao

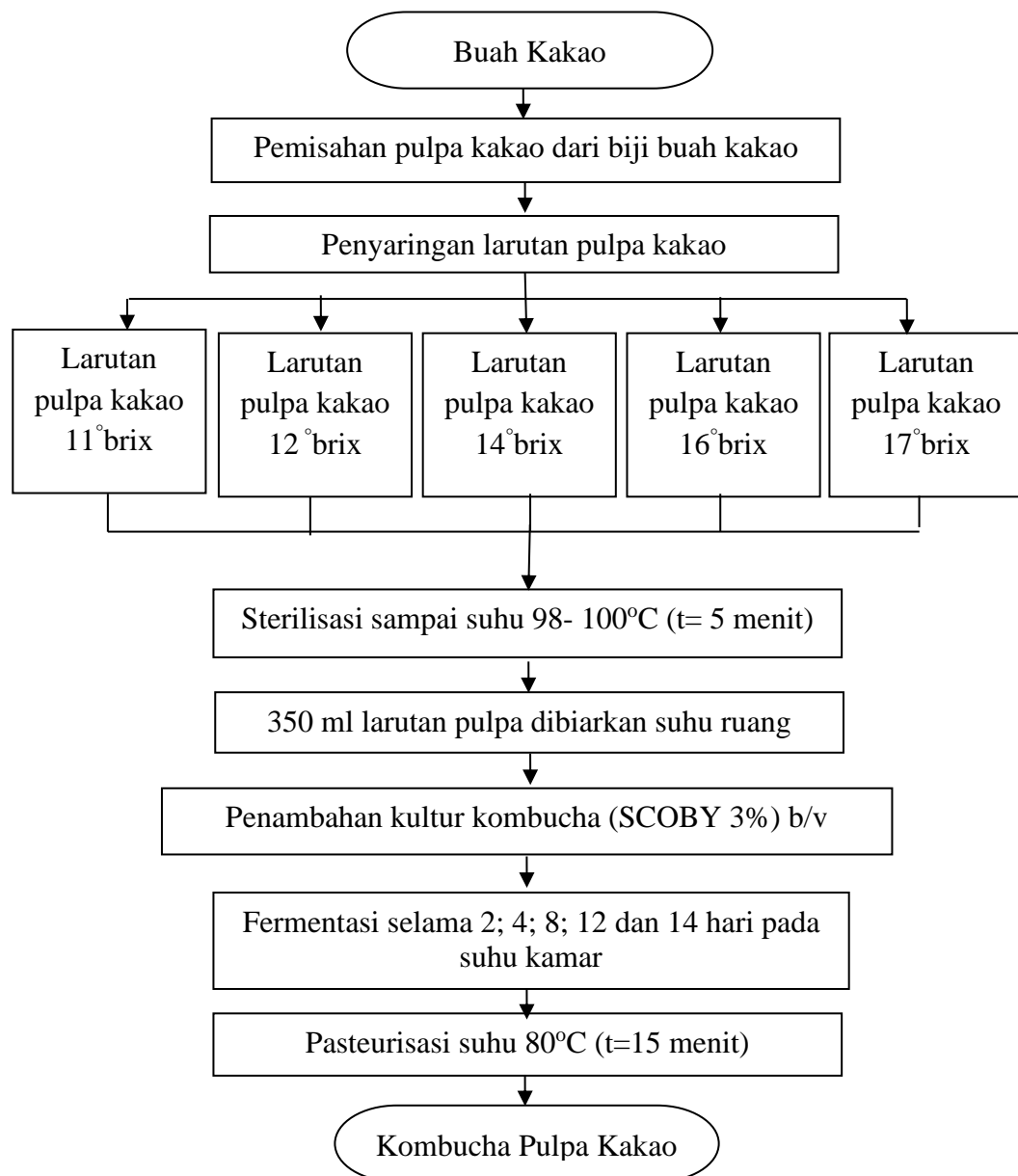
Tahapan awal pada proses pembuatan kombucha pulpa kakao yaitu menyiapkan media fermentasi berupa cairan pulpa kakao. Pulpa kakao yang telah dipisahkan dari biji kemudian disaring dengan kain saring 1 lapis dan dimasukkan ke dalam wadah berbeda. Cairan pulpa kakao yang diperoleh kemudian diukur derajat brix dengan *refractometer* (ATC) menghasilkan 11 °brix, 13 °brix, 14 °brix, 16 °brix dan 18 °brix. Selanjutnya untuk diperoleh derajat brix sesuai yang ditentukan program RSM maka dilakukan pencampuran cairan pulpa kakao antara 11 °brix dan 13 °brix (1:1) sehingga diperoleh cairan pulpa kakao 12 °brix. Kemudian dilakukan pencampuran cairan pulpa kakao antara 16 °brix dan 18 °brix (1:1) sehingga diperoleh cairan pulpa kakao 17 °brix. Selanjutnya masing - masing cairan pulpa kakao dikondisikan pada pH antara 3,42 - 3,53. Pada cairan pulpa kakao 14 °brix dilakukan penambahan asam citrun 1,75gr/ 350ml (b/v) untuk memperoleh pH 3,53. Selanjutnya masing- masing wadah berisi cairan pulpa disterilisasi pada suhu 98 - 100 °C selama 5 menit. Media kemudian dituang kedalam wadah steril ditutup rapat dan dibiarkan suhunya turun hingga suhu ruang dan siap untuk pembuatan kombucha.

### 3.4.2 Pembuatan Kombucha Pulpa

Pembuatan kombucha dilakukan dengan menambahkan starter SCOBY komersial pada wadah yang berisi media pulpa kakao sebelumnya. SCOBY ditambahkan secara aseptis dengan spatula sebanyak 3% (b/v).

### 3.4.3 Fermentasi

Media yang sudah ditambahkan SCOBY, ditutup rapat dengan kain. Kemudian diinkubasi untuk proses fermentasi selama 2 hari, 4 hari, 8 hari, 12 hari dan 14 hari pada suhu kamar. Kombucha pulpa kakao yang sudah jadi kemudian dipasteurisasi dengan suhu 80°C selama 15 menit. Selanjutnya kombucha dikemas dalam jar kaca dan disimpan dalam lemari pendingin. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao  
Sumber: Sari (2022), telah dimodifikasi.

### 3.5 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pengujian pH, total gula, total fenol, aktivitas antioksidan, warna dan sensori. Adapun tahapan masing-masing pengujian sebagai berikut:

### 3.5.1 Pengujian pH

Pengujian nilai pH kombucha pulpa kakao dilakukan menggunakan pH meter Digital ADWA. Pengujian ini dilakukan dengan mempersiapkan pH meter dan sampel dalam gelas yang akan diukur. Prosedur yang dilakukan untuk pengukuran pH pada sampel adalah sebagai berikut (Ikhsan *et al.*, 2018):

- 1) Kalibrasi pH meter dilakukan dengan cara mencelupkan elektroda pH meter ke dalam larutan buffer pH 6,86; pH 4,00; dan pH 9,18.
- 2) Elektroda pH meter dicuci dengan cara menyemprotkan akuades lalu dikeringkan menggunakan tisu
- 3) Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sampel yang diuji dan ditunggu sampai muncul angka yang menunjukkan besarnya nilai pH sampel
- 4) Elektroda pH meter dicuci kembali dengan cara menyemprotkan akuades lalu dikeringkan menggunakan tisu.

### 3.5.2 Pengujian Total Gula

Pengukuran total gula berdasarkan metode Dubois *et al.* (1956), Sebanyak 0,5 ml sampel ditambahkan 0,5 ml fenol 5% di dalam tabung reaksi 10 ml. Selanjutnya sampel dihomogenisasi menggunakan vortex. Setelah itu, larutan ditambahkan asam sulfat pekat sebanyak 2,5 ml dan didiamkan selama 10 menit. Lalu dihomogenisasi menggunakan vortex 30 detik dan didiamkan kembali selama 15-20 menit di dalam *water bath* berisi air hangat. Absorbansi larutan pada panjang gelombang 490 nm dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu). Kemudian hasil pengamatan diplotkan terhadap kurva standar glukosa dengan menggunakan persamaan regresi linier. Selanjutnya dihitung persentase total gula berdasarkan pengenceran yang dilakukan .

$$\text{Total Gula (\%)} = (G \times \text{FP}) \times 100$$

Keterangan: G = konsentrasi gula dari kurva standar (mg/ml)

FP =faktor pengenceran

### 3.5.2.1 Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Pembuatan kurva standar glukosa dibuat dengan cara membuat larutan induk glukosa. Pembuatan dilakukan dengan cara menimbang 100 mg glukosa kemudian dilarutkan dalam labu takar 100 ml dengan pelarut akuades hingga tanda tera. Lalu sebanyak 10 ml larutan induk dilarutkan dalam labu takar 100 ml dengan pelarut akuades hingga tanda tera. Dari larutan tersebut dipipet sebanyak 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 dan 1 ml, kemudian ditambahkan akuades masing-masing sampai volum akhir 1 ml. Selanjutnya dari masing- masing konsentrasi tersebut diambil sebanyak 0,5 ml untuk diukur absorbansinya. Hasil pengamatan dari masing- masing konsentrasi diplotkan menjadi kurva standar glukosa.

### 3.5.3 Pengujian Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan

#### 3.5.3.1 Penyiapan Ekstrak Sampel

Pengujian total fenol dan aktivitas antioksidan pada sampel kombucha diawali dengan penyiapan ekstrak. Sampel diambil sebanyak 5 ml kemudian ditambahkan 20 ml etanol p.a 96%, kemudian diekstraksi menggunakan *orbital shaker* (HS 50 1 digital IKA WERKE) selama  $\pm$  4 jam pada kecepatan 100 rpm pada suhu ruang. Ekstrak kombucha kemudian disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 2000 rpm, dan disaring menggunakan kertas saring Whatman 41 ukuran 20-25  $\mu$ m (Yilmaz-Ersan *et al.*, 2018).

#### 3.5.3.2 Pengujian Total Fenol dan Kurva Standar Asam Galat

Pengujian total fenol berdasarkan penelitian Ismail *et al.* (2012) menggunakan metode *Folin-ciocalteu* yang telah dimodifikasi. Prinsip metode ini adalah oksidasi senyawa fenol dalam suasana basa oleh pereaksi *Folin-ciocalteu* yang menghasilkan larutan berwarna biru. Sampel ekstrak sebanyak 0,2 ml disiapkan dan dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah diberi label lalu ditambahkan 0,2 ml akuades dan 0,2 ml reagen *Folin-ciocalteu* 50%, kemudian dihomogenisasi dengan vortex dan didiamkan selama 1 menit. Setelah

itu, campuran tersebut ditambahkan 4 ml larutan natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 2 % dan divortex satu menit, lalu didiamkan kembali selama 30 menit dalam ruang gelap pada suhu kamar. Setelah itu dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu) dengan panjang gelombang 760 nm. Hasilnya diplotkan terhadap kurva standar asam galat dengan menggunakan persamaan regresi linier. Hubungan antara konsentrasi asam galat dinyatakan sebagai sumbu x dan besarnya absorbansi hasil reaksi asam galat dengan pereaksi *Folin-ciocalteu* dinyatakan sebagai sumbu y.

$$y = ax + c$$

Keterangan:

y = Absorbansi sampel; x = Konsentrasi ekuivalen asam galat;

a = Gradien; c = Intersef.

Kurva standar asam galat dibuat dengan dengan cara membuat larutan induk. Pembuatan dilakukan dengan cara menimbang 10 mg asam galat, kemudian dilarutkan kedalam labu takar 100 ml dengan pelarut akuades hingga tanda tera. Dari larutan tersebut dipipet sebanyak 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Selanjutnya dari masing- masing kosentrasi tersebut diambil sebanyak 0,2 ml dan diberi perlakuan seperti sampel. Selanjutnya diukur absorbansinya panjang gelombang 760 nm. Hasil pengamatan dari masing- masing kosentrasi diplotkan menjadi kurva standar asam galat.

### 3.5.3.3 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Tahapan awal analisa antioksidan adalah dengan pembuatan larutan kontrol 2,2 *dipenyl-1-picrylhidrazyl* (DPPH) dengan metode yang telah dimodifikasi dari Shimamura *et al.* (2014). Larutan DPPH ditimbang 0,0078 g dalam ruang gelap kemudian dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 100 mL. Larutan DPPH 0,02 mM diambil 5 ml dimasukkan kedalam kuvet untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Hasil pengukuran absorbansi dihitung sebagai absorbansi kontrol (Ak). Pengujian larutan ekstrak dengan larutan ekstrak dipipet

1 ml dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 ml, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 5 mL untuk diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Larutan sampel yang didapat digunakan sebagai absorbansi sampel ( $A_s$ ). Kemudian absorbansi dari ekstrak yang diperoleh dibandingkan dengan absorbansi DPPH sehingga diperoleh persentase aktivitas antioksidannya. Menurut Brand-Williams *et al.* (1995), perhitungan persentase aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas antioksidan (\%)} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100\%$$

Keterangan:

$A_k$  = Absorbansi kontrol

$A_s$  = Absorbansi sampel

#### 3.5.3.4 Penentuan $IC_{50}$ dan Kurva Baku Asam Askorbat

Secara kuantitatif, prinsip pengujian ini adalah dengan dilakukan pengukuran penangkapan radikal DPPH oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dengan menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 517 nm, sehingga dengan demikian akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory Concentration*).  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi suatu bahan antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal. Penentuan nilai  $IC_{50}$  dibuat kurva hubungan antara konsentrasi sampel ( $X$ ) dengan aktivitas antioksidan ( $Y$ ), sehingga diperoleh suatu persamaan garis lurus. Nilai  $IC_{50}$  (ppm DPPH) diperoleh dengan cara memasukkan 50% aktivitas antioksidan pada persamaan garis lurus yang diperoleh.

Kurva baku asam askorbat dibuat dengan dengan cara membuat larutan stok. Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 5 mg asam askorbat yang dilarutkan dalam 5 mL etanol 96%. Selanjutnya dari larutan stok 1000 ppm

diambil masing-masing 10 $\mu$ L; 20  $\mu$ L, 30  $\mu$ L; 40  $\mu$ L dan 50  $\mu$ L ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, masing- masing tabung ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,2 mM dan ditambah etanol 96% hingga volume dalam tabung reaksi mencapai 10 ml. Sampel diinkubasi selama 30 menit ditempat yang tidak terkena cahaya. Sampel dipindahkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Hasil pengamatan dari masing- masing konsentrasi diplotkan menjadi kurva baku asam askorbat.

Sampel kombucha diekstrak terlebih dahulu dengan melarutkan 1 ml sampel dalam 10 ml etanol p.a 96%, kemudian diamkan selama 24 jam disuhu ruang. Selanjutnya larutan sampel disaring dengan kertas saring, dipipet dandimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 $\mu$ L, 10 $\mu$ L, 15 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, dan 25 $\mu$ L. Kemudian ditambahkan 1 ml larutan DPPH 0,2 mM dan ditambah etanol p.a 96% hingga volume dalam tabung reaksi mencapai 10 ml. Sampel diinkubasi selama 30 menit diruang gelap. Sampel dipindahkan ke dalam kuvet dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Pembuatan larutan kontrol yaitu dengan menambahkan metanol ke dalam 1 ml larutan DPPH 0,2 mM hingga volume dalam tabung reaksi mencapai 10 ml. Hasil pengamatan dari masing- masing konsentrasi diplotkan menjadi nilai IC<sub>50</sub> kombucha.

#### 3.5.4 Pengujian Warna

Pengujian warna kombucha pulpa kakao dilakukan dengan menggunakan alat *color meter portable* (Tongbao TES- 135A). Sampel sebanyak 15 ml diletakkan dalam wadah gelas lempeng lalu *color meter* diletakkan 2 cm diatasnya dan ditekan tombol 'on', setelah itu dilakukan pengukuran nilai L, a, b. Koordinat-koordinat ini menunjukkan sistem tiga dimensi yaitu merah, hijau dan biru (RGB) yang mengandung semua warna. Nilai L mewakili Lightness yaitu 0 untuk warna hitam dan 100 untuk warna putih, axis a menunjukkan intensitas warna merah (+) dan hijau (-), axis b menunjukkan warna kuning (+) atau biru (-). Corak warna ( $^{\circ}$ Hue) [ $\text{hue} (h_{ab} = \arctan (b^*/a^*))$ ] menyatakan warna sebenarnya seperti merah, violet, dan kuning dengan sudut warna dari 0 $^{\circ}$  - 360 $^{\circ}$ . Perubahan warna pada



sampel akan dibedakan berdasarkan perbedaan warna  $\Delta E$  dimana pengaruhnya tidak terlihat jika  $<0,2$ ; sangat kecil jika  $0,2 - 1,0$ ; kecil jika  $1,0 - 3,0$ ; sedang jika  $3,0 - 6,0$  dan besar jika  $>6,0$ . Total Perubahan warna  $\Delta E$  dihitung menurut (Method OIV-MA-AS2-11, 2006) menggunakan rumus dibawah ini:

$$\Delta E_x = \sqrt{(L_x^* - L_0^*)^2 + (a_x^* - a_0^*)^2 + (b_x^* - b_0^*)^2}$$

### 3.5.5 Pengujian Sensori

Uji sensori berdasarkan metode Abuduaibifu dan Tamer (2019) yang telah dimodifikasi. Uji sensori dilakukan dengan menggunakan uji hedonik oleh masyarakat umum berjumlah 40 orang. Kriteria umum panelis yang dipilih berdasarkan kisaran umur 18-30 tahun, dalam keadaan sehat, tidak memiliki alergi terhadap bahan yang terdapat dalam formula dan bersedia mengikuti pengujian ini hingga selesai. Sampel yang diuji adalah minuman kombucha pulpa kakao. Sampel disajikan secara acak kepada panelis dalam wadah yang telah diberi kode dan diberi penawar berupa air tawar. Panelis akan menuliskan hasil pendapatnya pada kuesioner yang berisi nama, umur, tanggal, petunjuk pengisian, skor penilaian, dan kode sampel. Kuesioner penilaian uji sensori minuman kombucha pulpa kakao dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Kuesioner uji skoring minuman kombucha pulpa kakao

Nama panelis	:	
Umur	:	
Tanggal pengujian	:	
Produk	:	Minuman kombucha pulpa kakao

**KUISIONER UJI HEDONIK (KONSISTEN)**

**A. Uji Hedonik**

**Petunjuk pengisian:**  
Dihadapan Saudara/i disajikan 15 sampel minuman kombucha berbahan dasar pulpa kakao yang berkode. Saudara/i diminta untuk menilai kesukaan terhadap **aroma, warna, rasa, dan penerimaan keseluruhan** dengan cara memberikan skor pada masing-masing sampel.

Parameter	118	124	122	141	142	143	144	145	146	147	162	164	178	140
Aroma														
Warna														
Rasa														
Penerimaan keseluruhan														

**Keterangan:**

1. Sangat tidak suka
2. Tidak suka
3. Agak tidak suka
4. Agak suka
5. Suka
6. Sangat suka
7. Amat sangat suka

**B. Alasan Memilih Suka atau Tidak Suka**

**Pejunjuk pengisian:**  
Saudara/i diminta untuk menuliskan alasan memilih suka/tidak suka terhadap produk yang dipilih berdasarkan “**aroma, warna, dan rasa**” pada kolom yang sudah disediakan.

<b>Alasan memilih suka (berdasarkan aroma, warna, dan rasa):</b>	<b>Alasan memilih tidak suka (berdasarkan aroma, warna, dan rasa):</b>
--	--

## **V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Kombucha yang menghasilkan kondisi optimum adalah kombucha pada perlakuan 12 °brix dan difermentasi 4 hari. Kombucha ini memiliki total fenol tertinggi sebesar 4,13 mgGAE/gr; aktivitas antioksidan terbaik sebesar 89,12 %; pH sebesar 3,33; total gula sebesar 4,61 %; nilai L\* sebesar 87,88; nilai a\* sebesar 17,26; nilai b\* sebesar -6,83; corak warna sebesar 338,39; perubahan warna sebesar 2,91; aroma kombucha sebesar 4,25; warna kombucha sebesar 4,25; rasa kombucha sebesar 3,97 dan penerimaan keseluruhan sebesar 4,31.

### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk meningkatkan skor sensori agar menjadi kombucha pulpa kakao yang lebih disukai.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abaci, N., Deniz, F. S. S. and Orhan, I. E. 2022. Kombucha- an ancient fermented beverage with desired bioactivities: a narrowed review. *Food Chemistry X*. 14: 100302. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100302>
- Abuduaibifu, A., and Tamer, C. E. 2019. Evaluation of physicochemical and bioaccessibility properties of goji berry kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation*. 43(9): 1–14. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14077>
- Adabe, K. E. and Ngo-Samnick, E. L. 2014. *Cocoa production and processing*. The Technical Center for Agricultural and Rural Cooperation (CTA). Netherland.
- Afoakwa, E. O. 2016. *Chocolate Science And Technology*. John Wiley &Son Ltd. UK.
- Afolabi, M. O., Ibitoye, W. O. and Agbaje, A. F . 2015. Evaluation of nutritional and sensory properties of cocoa pulp beverage supplemented with pineapple juice. *Journal of Food Research*. 4(6). <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n6p58>
- Andrade, A. B. D., Souza, C. C. A. D., Grimaut, D. A., Porto, E. A., Silva, G. D. S., Silva, J. S. D. J., Santana, J. D. J., Bastos, L. C., Silva, R, N. A. D., Anunciação, T. A. D., Soares S. E. and Magalhães-Guedes, K. T. 2020. Kombucha-based cocoa honey beverage. *World Applied Sciences Journal*. 38 (1): 58-64. [http://www.idosi.org/wasj/wasj38\(1\)20/8.pdf](http://www.idosi.org/wasj/wasj38(1)20/8.pdf)
- Antolak, H., Piechota D. and Kucharska, A. 2021. Review kombucha tea—a double power of bioactive compounds from tea and symbiotic culture of bacteria and yeasts (SCOBY). *Journal Antioxidants*. 10 (10): 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Ardika, P. J. 2021. *Plt. Direktorat Jenderal Industri Agro Kemenperin: Kinerja Industri Pengolahan Kakao Kian Manis*. <https://kemenperin.go.id> diakses tanggal 13 Juni 2022
- Ayed, L., Abid, S. B. and Hamdi, M. 2017. Development of a beverage from red grape juice fermented with the kombucha consortium. *J. Annals of Microbiology* (67): 111–121. <https://doi:10.1007/s13213-016-1242-2>

- Ayu, S., Yan, R. and Eka, L. 2013. Penetapan Antioksidan pada Teh Hitam Kombucha Lokal di Bali dengan Waktu Fermentasi. *Jurnal Farmasi Udayana*. 2(1).
- BALITTRI. 2016. Pulpa Kakao, Tak Hanya Sekedar Limbah. <http://balittri.litbang.pertanian.go.id/index.php/berita/berita-lain/346-pulpa-kakao-tak-hanya-sekedar-limbah>. Diakses 10 Juni 2022.
- Bi, Y., Zielinska, S., Ni, J., Li, X., Xue, X., Tian, W., Peng, W. and Fang, X. 2022. Effects of hot-air drying temperature on drying characteristics and color deterioration of rape bee pollen. *Journal Food Chemistry X*. 16: 100464. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100464>
- Bishop, P., Pitts, E. R., Budner, D. and Thompson-Witricka, K. A. 2022. Kombucha: Biochemical and microbiological impacts on the chemical and flavor profile. *Journal Food Chemistry Advances*. 1: 100025. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100025>
- Bortolomedi, B. M., Paglarini, S. P. and Brod, F. C. A. 2022. Bioactive compounds in kombucha: a review of substrate effect and fermentation conditions. *J. Food Chemistry*. 385: 132719. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132719>
- BPS. 2020. Statistik kakao Indonesia 2020. <https://www.bps.go.id/publication/2021/11/30/a553dc1b3648d2f5cdad1789/statistik-kakao-indonesia-2020.html>
- BPS. 2022. Statistik kakao Indonesia 2021. <https://www.bps.go.id/publication/2022/>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28 (1): 25- 30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brasil. 2019. Estabelece o padrão de identidade e qualidade da kombucha em todo o território nacional (instrução normativa no. 41, de 17 de setembro de 2019). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Brasília. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-41-de-17-de-setembro-de-2019-216803534>
- Cabosse naturals nv. 2020. *Gras Conclusion For The Use Of Cacao Pulp, Juice And Concentrate In Select Foods*. U.S. Food and Drug Administration. Washington DC.
- Cahyadi, A. B. 2018. *Karakteristik fisik, kimia, organoleptic dan mikrobiologi kombucha berbasis buah-buahan*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.

- Center for Disease Control. 2020. Food safety assessment of kombucha tea recipe and food safety plan. *Environmental Health Service*. British Columbia. 1-14.
- Chahyaditha, E. M. 2011. *Pembuatan Pektin dari Kulit Buah Kakao dengan Kapasitas Produksi 20.000 Ton/ Tahun*. Skripsi. Universitas Sumatra. Medan.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D. and Gachhui, R. 2016. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology*. 220: 63–72. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>
- Chandrasekaran, M. 2012. *Valorization Of Food Processing By-Products*. Broken Sound Parkway NW: CRC press, Taylor and Francis Group.
- Cheng, Y., Hyunh-Ba, T. and Robert, F. 2016. Temporal change in aroma release of longjing tea infusion: interaction of volatile and nonvolatile tea component and formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2160- 2169.
- Christi, A. G. J. 2015. *Optimasi Formula Film Berbasis Amilopektin Pati Singkong Dan Karagenan Sebagai Bahan Baku Cangkang Kapsul*. Thesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Crum, H. and Lagory, A. 2016. *The big book of Kombucha: Brewing, flavoring, and enjoying the health benefits of fermented tea*. North Adams. MA: Storey Publishing.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350- 356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dutta, H. and Paul, S. Kr. 2019. Kombucha drink: production, quality, and safety aspects. *Journal Production and Management of Beverages*. 1: 259- 288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815260-7.00008-0>
- Emiljanowicz, K.E. and Malinowska-Panczyk, E. 2019. Kombucha from alternative raw materials–The review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 60: 3185- 3194. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714>
- Endah, T. 2016. *Kajian Konsentrasi Sukrosa Dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Teh Kombucha Ekstrak Kulit Salak Varietas Bongkok*. Skripsi. Universitas Pasundan. Bandung.
- Endriyani, V., Ludescher, R. D., Di, R. and Karwe, M. V. 2016. Total phenolics and antioxidant capacity of cacao pulp: processing and storage study. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(4).

<https://doi.org/10.1111/jfpp.13029>

- Fahrurrozi, Lisdiyanti, P., Ratnakomala, S., Fauziyyah, S. dan Sari, M. N. 2020. *Teknologi Fermentasi Dan Pengolahan Biji Kakao*. LIPI Press. Jakarta. 49-57.
- Figuroa, K. H. N., Garcia, N. V. M. and Vega, R. C. 2020. *Food Waste and By-Products: Nutraceutical and Health Potential. Chapter 13: Cocoa By-products*. John Wiley & Sons Ltd.: 373-411.
- Filippis, F., D., Troise, A., D., Vitaglione, P. and Ercolini, D. 2018. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and production during kombucha tea fermentation. *J. Sciencedirect*. 73: 11- 16.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>
- Fransiska, N. 2018. *Stabilitas Emulsi Dengan Penstabil Pati Termodifikasi Dan Pengaruh Jenis Gula Terhadap Aktivitas Antioksidan Minuman Emulsi Jernang (daemonorops deaco willd)*. Skripsi. Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Jambi.
- Frias, J., Martinez-Villaluenga, C. and Penas, E. 2017. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Nikki Levy. Elsier Inc. UK.
- Gomes, R., J., Borges, M., de F., Rosa, M., de F., Castro-Gómez, R., J., H. and Spinosa, W. A. 2018. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *J. Food Technology and Biotechnology*. 56(2). <https://doi:10.17113/ftb.56.02.18.5593>
- Handoko, Harisman, E. K. and Puspita, Y. E. 2020. The kombucha from *Rhizophora mucronata lam*. Herbal tea: characteristics and the potential as an antidiabetic beverage. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*. 8(5): 410- 421. ORCID:0000-0002-0395-9589.
- Hapsari, M. W., Rizkiprillisa, W. dan Sari, A. P. 2021. Pengaruh lama fermentasi terhadap aktivitas antioksidan minuman fermentasi kombucha lengkuas merah (*Alpinia purpurata*). *Jurnal Ilmiah AGROMIX*. 12(2): 146- 149.  
<https://doi.org/10.35891/agx.v12i2.2647>
- Hartarto, A. 2019. Industri kakao sumbang devisa negara hingga USD 1,13M. [https://www.indopremier.com/ipotnews/newsDetail.php?jdl=Industri\\_Kakao\\_Sumbang\\_Devisa\\_Negara\\_Hingga\\_USD1\\_13\\_Miliar&news\\_id=110041&group\\_news=IPOTNEWS&news\\_date=&taging\\_subtype=PERKEBUNAN&name=&search=y\\_general&q=kakao,%20cokelat&halaman=1](https://www.indopremier.com/ipotnews/newsDetail.php?jdl=Industri_Kakao_Sumbang_Devisa_Negara_Hingga_USD1_13_Miliar&news_id=110041&group_news=IPOTNEWS&news_date=&taging_subtype=PERKEBUNAN&name=&search=y_general&q=kakao,%20cokelat&halaman=1)
- Hasan, S. A. and Janeen, S. 2015. Degradation kinetics and pathway of phenol by pseudomonas and bacillus species. *J. Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 29(1): 45- 53. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.991638>

- Hassmy, N. P., Abidjulu, J. dan Yudistira, A. 2017. Analisis aktivitas antioksidan pada teh hijau kombucha berdasarkan waktu fermentasi yang optimal. *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT*. 6(4). ID:149530645
- Hu, T., Shi, S., and Ma, Q. 2022. Modulation effects of microorganisms on tea in fermentation. *Journal Frontiers in Nutrition*. 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.931790>
- Hur, S. J., Lee, S. Y., Kim, Y. C., Choi, I. and Kim, G. B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry*. 160: 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.112>
- Hustiany, R. 2016. Reaksi Maillard Pembentuk Citarasa dan Warna Pada produk Pangan. Lambung Mangkurat University Press. Banjarmasin. 8- 14.
- Hutching, J., B. 1999. *Food Color and Appearance 2<sup>nd</sup> edition A Chapman and Hall Food Science Book*. Maryland. Aspen's Publition.
- ICCO (International Cocoa Organization). 2018. *ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*. XLIV(4). Cocoa year 2017/18.
- Ikhsan, M. A. R., Rosalina, Y. dan Susanti, I. 2018. Pengaruh penambahan asam sitrat dan jenis kemasan terhadap perubahan mutu sari buah jeruk kalamansi selama penyimpanan pada suhu ruang. *Jurnal Agroindustri*. 8(2): 139-149. <https://doi.org/10.31186/j.agroind.8.2.139-149>
- Ismail, J., Runtuwene, M. R. J. dan Fatimah. 2012. Penentuan total fenolik dan uji aktivitas antioksidan pada biji dan kulit buah pinang yaki (*areca vestiaria giseke*). *Jurnal Ilmiah Sains*. 12(2): 84 -88. <https://doi.org/10.35799/jis.12.2.2012.557>
- JACRA (Jamaica Agriculture Commodities Regulatory Authority). 2022. Cacao Varieties. <https://jacra.org/divisions/cocoa/cocoa-varieties/>
- Jakubczyk, K., Kupnicka, P., Melkis, K., Mielczarek, O., Walczynska, J., Chlubek, D. and Janda-Milczarek, K. 2022. Effects of fermentation time and type of tea on content of micronutrients in kombucha fermented tea. *J. Nutrients*. 14(22): 4828. <https://doi.org/10.3390/nu14224828>
- Jayabalan, R., Marimuthu S. and Swaminathan, K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chem*. 102(1):392– 8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
- Jeanroy A. and Wasserman, M. 2019 . *Fermenting for Dummies*. John Wiley & Sons INC International Concepts.



- Junior, J. C. D. S., Mafaldo, I. M., Brito, I. D. L. and Cordeiro, A. M. T. D. M. 2022. Kombucha: formulation, chemical composition and therapeutic potentialities. *Current Research in Food Science*. 5: 360- 365. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.023>
- Kaur, P., Mehta, R. G., Robin, Thind, T. S. and Arora, S. 2021. *Bentham briefs in biomedicine and pharmacotherapy. Oxidative stress and natural antioxidants*. Bentham Science Publishers Pte. Ltd. Singapore. 1: 14.
- Kemendagri. 2020. Warta daglu: Mewartakan Kinerja Perdagangan Luar Negeri. News Letter Desember 2021. <http://bppp.kemendag.go.id>
- Kementan. 2019. *Hulu Hilir Kakao*. Pusat Perpustakaan dan Penyebaran Teknologi Pertanian. Bogor. 89.
- Khamidah, A. dan Antarlina, S. S. 2020. Peluang Minuman Kombucha Sebagai Pangan Fungsional. *Agrika: Jurnal Ilmu- Ilmu Pertanian*. 14(2): 184. <https://doi.org/10.31328/ja.v14i2.1753>
- Kombucha Brewers International. 2021. Kombucha code of practice. <https://kombuchabrewers.org/kombucha-code-of-practice/>
- Kumar, S. and Pandey, A., K. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*. 58(4):145–8. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Xiao, L., Li, X. and Hu, M. 2017. Effect of fermentation parameters and their optimization on the phytochemical properties of lactic acid fermented mulberry juice. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 11(3): 1462–1473. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9525-2>
- Lalong, P. R. F., Zubaidah, E. dan Martati, E. 2022. Karakteristik kimia dan potensi antioksidan dari kombucha berbahan kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida R.Br*). *Jurnal Yudharta: Teknologi Pangan*. 13(1): 134- 143. <https://doi.org/10.35891/tp.v13i1.2873>
- Laureys, D., Britton, S., J. and De Clippeleer, J. 2020. Kombucha tea fermentation: a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 78(3): 165–174. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1734150>
- Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H. and Escalante-Aburto, A. 2018. A review on health benefits of Kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA - Journal of Food*. 16(1): 390- 399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>

- Leonarski, E., Guimaraes, A. C., Cesca, K. and Poletto, P. 2022. Production process and characteristics of kombucha fermented from alternative raw materials. *Journal Food Bioscience*. 49: 101841. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101841>
- Li, S., Zhang, Y., Gao, J., Li, T., Li, H., Mastroyannis, A., He, S., Rahaman, A. and Chang, K. 2022. Effect of fermentation time on physiochemical properties of kombucha produced from different teas and fruit: comparative study. *Journal of Food Quality*. (1): 1- 10. <https://doi.org/10.1155/2022/2342954>
- Lu, Y., Mu, K., McClements, D. J., Liang, X., Liu, X. and Liu, F. 2020. Fermentation of tomato juice improves in vitro bioaccessibility of lycopene. *Journal of Functional Foods*. 71: 104020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104020>
- Mamta, Misra, K., Dhillon, G. S., Brar, S. K. and Verma, M. 2013. *Antioxidants. Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. 6: 117–138. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8005-1_6)
- Marnpae, M., Chusak, C., Balmori, V., Kamonsuwan, K., Dahlan, W., Nhujak, T., Hamid, N. and Adisakwattana, S. 2022. Probiotic gac fruit beverage fermented with *Lactobacillus paracasei*: Physiochemical properties, phytochemicals, antioxidant activities, functional properties, and volatile flavor compounds. *J. LWT- Food Science and Technology*. (169): 113986. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113986>
- Marsh, A. J., O’Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P. and Cotter, P., D. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) sampel. *Journal Food Microbiology*. 38: 171- 178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Massoud, R., Jafari-Dastjerdeh, R., Naghavi, N. and Darani, K. K. 2022. All Aspects of Antioxidant Properties of Kombucha Drink. *Journal Biointerface Research in Applied Chemistry*. 12 (3): 4018- 4027. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.40184027>
- Mendoza-Meneses, C. J., Feregrino-Peres, A. A. and Gutierrez-Antonio, C. 2021. Potential use of industrial cocoa waste in biofuel production. *Journal of Chemistry*. 1-11. <https://doi.org/10.1155/2021/3388067>
- Method OIV-MA-AS2-11. 2006. Determination of chromatic characteristics according to CIELab. *Compendium of International Analysis of Methods – OIV Chromatic Characteristics R2006*:1–16.
- Miranda, B., Lawton, N. M., Tachibana, S. R., Swartz, N. A. and Hall, W. P. 2016. Titration and HPLC characterization of kombucha fermentation: a

- laboratory experiment in food analysis. *Journal Cham. Educ.* 93(1): 1770-1775. <https://eric.ed.gov/?id=EJ1117486>
- Miranda, J. F. D., Ruiz, L. F., Silva, C. B., Uekane, T. M., Silva, K. A., Gonzalez, A. G. M., Fernandes, F. F. and Lima, A. R. 2021. Kombucha: a review of substrates, regulations, composition and biological properties. *Journal Food Science.* 87 (2): 503- 527. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16029>
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radicals diphenylpicrylhydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science Technology.* 26(2): 211-219
- Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Zarei, M., Gholami, A., Lai, C. W., Chiang, W. H., Omidifar, N., Bahrani, S. and Mazraedoost, S. 2020. Review article recent progress in chemical composition, production, and pharmaceutical effects of kombucha beverage: a complementary and alternative medicine. *Journal Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicin.* <https://doi.org/10.1155/2020/4397543>
- Muhalidin, B. J., Osman, F. A., Muhamad, R., Che Wan Sapawi, C. W. N. S., Anzian, A., Voon, W. W. Y. and Meor Hussin, A. S. 2019. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. *International Food Research Journal.* 26(2): 481-487.
- Murugan, K and S. Al-Sohaibani. 2012. *Coffee, Tea and Cocoa.* In Chandrasekaran, M. (ed). *Valorization of Food Processing By-products.* CRC Press Taylor and Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW. p. 455- 488.
- Ninda, F., S. 2022. *Sensori Kombucha Pulpa Kakao Dan Pendugaan Harga Pokok Produksi: Efek Penambahan Jahe (Zingiber officinale).* Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.
- Nunes, C. S. O., da Silva, M. L. C., Camilloto, G. P., Machado, B. A. S., Hodel, K. V. S., Koblitz, M. G. B., Carvalho, G. B. M. and Uetanabar, A. P. T. 2020. Potential applicability of cocoa pulp (*Theobroma cacao l*) as an adjunct for beer production. *The Scientific World Journal.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3192585>
- Nurfaillah, Masri, Sari, E. R., Herlinda dan Patang. 2018. Pemanfaatan limbah pulpa kakao menjadi nata de cacao. *BIONATURE: Jurnal Kajian dan Penelitian Biologi.* 4: 24 – 33. <https://doi.org/10.26858/JPTP.V4I2.6609>
- Nurhayati, Yuwanti, S. dan Urbahillah, A. 2020. Karakteristik fisikokimia dan sensori kombucha cascara (kulit kopi ranum). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan.* 31(1): 38-49. <https://doi.org/10.6066/jtip.2020.31.1.38>

- Oddoye, E. O. K., Agyente-Badu, C. K. and Gyedu-Akoto, E. 2013. *Cocoa and its by-products: identification and utilization. Chocolate in Health and Nutrition*. R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. Zibadi, Eds., Humana Press, Totowa. NJ USA. 23–37.
- Ozyurt, V. H. 2020. Changes in the content of total polyphenols and the antioxidant activity of different beverages obtained by kombucha ‘tea fungus’. *International Journal of Agriculture, Environment and Food Sciences*. 4 (3): 255-261. <https://doi.org/10.31015/jaefs.2020.3.3>
- Palmer, J. 2013. *Water: A comprehensive guide for brewers*. Boulder, CO: Brewers Publication.
- Pothakos, V., Illeghems, K., Laureys, D. and Vuyst, L. D. 2016. Acetic acid bacteria in fermented food and beverage ecosystems. *Acetic Acid Bacteria*. Springer. Tokyo: 73- 99. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55933-7_3)
- Pratama, S. 2022. *Pengaruh Kosentrasi Gula Dan Lama Fermentasi Terhadap Minuman Kombucha Secang (Caesalpinia sappan L.)*. Skripsi. Teknologi Pangan Fakultas Pertanian USU. Sumatera Utara.
- Pratiwi,A., Elfita, dan Aryawati, R. 2012. Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Sifat Fisik dan Kimia pada Pembuatan Minuman Kombucha dari Rumput Laut *Sargassum sp. Maspari Journal: Marine Science Research*. 4(1): 131-136.
- Primurdia, E., G. dan Kusnadi, J. 2014. Aktivitas antioksidan minuman probiotik sari kurma (phoenix dactilyfera l.) Dengan isolat l. Plantarum dan l. Case. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3):98–109. <https://doaj.org/article/563fb009860a4d7a930e12c4b8ebb6f8>
- Pure, A. E. and Pure, M. E. 2016. Antioxidant, antibacterial and color analysis of garlic fermented in kombucha and red grape vinegar. *J. Applied Food Biotechnology*. 3(4):246-252. <https://doaj.org/article/7bbf7aa61b5c4fdabc550db2392f656>
- Purnami, K. I., Jambe, A. dan Wisaniyasa, N. W. 2018. Pengaruh jenis teh terhadap karakteristik kombucha. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 7(2): 1- 10. <https://doi.org/10.24843/itepa.2018.v07.i02.p01>
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia . 2012 . *Klon-klon unggul kakao lindak*. 62(90).
- Putra, A., Muhaimin dan Wulansari, D. 2021. Pengaruh proses fermentasi kombucha the daun pedada terhadap sifat fisikokimia. *Jurnal Repository Universitas Jambi*.

- Rahardjo, P. 2011. *Menghasilkan Benih dan Bibit Kakao Unggul*. Rahardjo Pudji. Jakarta. Halaman: 8.
- Raissi, S. and Farsani, R. E. 2009. Statistical process optimization through multi-respon surface methodology. *International Journal of Mathematical and Computational Sciences*. 3(3): 197- 201.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1083451>
- Safitri, D. 2019. *Pengaruh lama fermentasi limbah cair pulp kakao (Theobroma cacao l.) Sebagai bioherbisida gulma belulang (eleusine indicul.)*. Skripsi. UIN Raden Intan. Lampung.
- Sanchez, N. F. S., Coronado, C. V. and Carlos B. H. 2019. *Antioxidant compound and their mechanism*. 4-5. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85270>
- Sankaranarayanan, A., Amaresan, N. and Dhanasekaran, D. 2020. *Fermented Food Product*. CRC Press. London New York.
- Sari, G. W. 2022. *Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Kombucha Pulpa Kakao (Theobroma cacao Linn) Yang Difermentasi Menggunakan Starter Simbiosis Bakteri-Khamir*. Skripsi. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Universitas Lampung. Lampung.
- Scheuer, P. M., Southgate, A. N. N. and Martelli, M. F. 2020. Quality properties of a bread made with levain and cocoa waste. *Journal of Culinary Science & Technology*. 1-12. <https://doi.org/10.1080/15428052.2020.1848685>
- Shi, H.Q., Zhou, X.Y., Yao, Y.P., Qu, A.Y., Ding, K.L. and Zhao, G.Z. 2022. Insights into the microbiota and driving forces to control the quality of vinegar. *Journal Food Science and Technology*. (157): 113085.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113085>
- Shimamura, T., Sumikura, Y., Yamazaki, T., Tada, A., Kashiwagi, T., Ishikawa, H., Matsui, T., Sugimoto, N., akiyama, H. and ukeda, H. 2014. Applicability of the DPPH assay for evaluating the antioxidant capacity of food additives-inter-laboratory evaluation study. *Jurnal Analytical Science*. 30(7): 717- 721. <https://doi.org/10.2116/analsci.30.717>
- Siagian, P. 2012. *Keajaiban Antioksidan*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 1-7.
- Simanjuntak, R. J. D. 2017. *Efek Antibakteri Kopi Robusta yang Difermentasi dengan Kombucha Terhadap Salmonella typhi*. Skripsi. Universitas Lampung.
- Soares, M. G., Lima, M. D. and Schmidt, V. C. R. 2021. Technological aspects of kombucha, its applications and the symbiotic culture (SCOBY) and extraction of compounds of interest: a literature review. *Journal Trends in*

*Food Science and Technology*. 110: 539-550.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.017>

- Suhardini, P. N. dan Zubaidah, E. 2016. Studi aktivitas antioksidan kombucha dari berbagai jenis daun selama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4(1): .221-229.
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M., and Zhao, Y. P. 2014. Selected non-Saccharomyces wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines. *J. Food Microbiology*. 44(5): 15–23.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.007>
- Suryana, A. T., Fariyanti, A. dan Rifin, A. 2014. Analisis perdagangan kakao Indonesia di pasar internasional. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 1(1), 29-40.
- Syari, O. 2022. *Sensori Kombucha Pulpa Kakao Dan Pendugaan Harga Pokok Produksi: Efek Penambahan Kayu Manis (Cinnamomun burmanii)*. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung.
- Towaha, J. 2013. Diversifikasi produk berbasis pulpa kakao. *SIRINOV*. 1(2): 57-74.
- Tran, T., Grandvalet, C., Verdier, F., Martin, A., Alexandre, H. and Maréchal, R. T. 2020. Microbiological and technological parameters impacting the chemical composition and sensory quality of kombucha. *J. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19(4): 2050–2070.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12574>
- Tyassuma, T. 2018. *Body Revolution*. Yayasan AHLINA. Jakarta Pusat. 171.
- Vásquez, Z. S., Neto, D. P. D. C., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L.G., Neto, A. G. and Soccol, C. R. 2019. Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *J. Waste Management*. 90: 72- 83.  
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, L., Souchard, J. and Taillandier, P. 2018. Understanding kombucha tea fermentation: a review. *Journal of Food Science*. 83(3): 580- 588.<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- Vitas, J. S., Malbaša, R. V., Grahovac, J. A. and Lončar, E. S. 2013. The antioxidant activity of kombucha fermented milk products with stinging nettle and winter savory. *J. Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*. 19(1): 129–139. <https://doi.org/10.2298/CICEQ120205048V>

- Watawana, M. I., Jayawardana, N., Gunawardhana, C. B. and Waisundara, V. Y. 2015. Review: health, wellness and safety aspect of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*. 2015: 1- 11.  
<https://doi.org/10.1155/2015/591869>
- Watawana, M., I., Jayawardana, N. and Waisundara, V., Y. 2018. Value- added tea (*camellia sinensis*) as a functional food using the kombucha 'tea fungus'. *Chiang Mai Journal of Science*. 45(1): 136–146.  
<http://cmuir.cmu.ac.th/jspui/handle/6653943832/64013>
- Watson, R. R., Preedy, V. R., and Zibadi, S. 2012. *Chocolate In Health And Nutrition*. New York Heidelberg Dordrecht London: Humana Press brand of Springer.
- Wistiana, D. dan Zubaidah, E. 2015. Karakteristik kimiawi dan mikrobiologis kombucha dari berbagai daun tinggi fenol selama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3( 4): 1446-1457.
- Wolfe, B., E . and Dutton, R., J. 2015. Fermented food as experimentally tractable microbial ecosystems. *Journal Cell*. 161(1): 49- 55.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>
- Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayizit, A. and Sahin, S. 2018. Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefir. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 3788- 3798. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13871>
- Yuliana, N., Widiastuti, E. L. and Setiawan T. 2018. *Paten Proses Pembuatan Minuman Kombucha Pulpa Kakao*. IDS000002147.
- Zailani, N. S. and Adnan, A. 2022. Substrates and metabolic pathways in symbiotic culture of bacteria and yeast (scooby) fermentation: a mini review. *Journal Teknologi (Sciences and Engineering)*. 84(5): 155–165.  
<https://doi.org/10.11113/jurnalteknologi.v84.18534>
- Zofia, N. L., Aleksandra, Z., Tomasz, B., Martyna, Z. D., Magdalena, Z., Zofia, H. B. and Toma, W. 2020. Article: effect of fermentation time on antioxidant and anti-ageing properties of green coffee kombucha ferments. *Journal Molecules*. 25(22): 5394.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25225394>
- Zou, C., Li, R., Chen, J., Wang, F., Gao, Y., Fu, Y., Xu, Y. and Yin, J. 2021. Zijuan tea- based kombucha: physicochemical, sensorial, and antioxidant profile. *J. Food Chemistry* (363):130322.  
<https://doi:10.1016/j.foodchem.2021.130322>
- Zubaidah, E., Iastika, A. R., Widyaningsih, T. D. and Febrianto, K. 2021. Immunomodulatory activity of black tea kombucha (*camellia sinensis*) and arabica coffee leaves tea kombucha (*coffee arabica*) for salmonella typhi-

infected mice. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 733(2021): 012128. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/733/1/012128>

Zubaidah, E., Ifadah, R. A. and Afgani, C. A. 2019. Changes in chemical characteristics of kombucha from various cultivars of snake fruit during fermentation. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 230 (2019): 012098. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012098>

Zubaidah, E., Ifadah, R. A., Kalsum, U., Lyrawati, D., Putri, W. D. R., Srianta, I. and Blanc, P. J. 2018. Anti-diabetes activity of kombucha prepared from different snake fruit cultivars. *Journal Nutrition & Food Science*. 49 (2): 333- 343. <https://doi.org/10.1108/NFS-07-2018-0201>

Zubaidah, E., Yurista, S. and Rahmadani, N. R. 2018. Characteristic of physical, chemical, and microbiological kombucha from various varieties of apples. *J. International Conference on Green Agro-industry and Bioeconom. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 131(2018): 012040. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/131/1/012040>