

**PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK
MINUMAN KOMBUCHA PULPA KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
SELAMA FERMENTASI**

SKRIPSI

Oleh

**CAHYA YOLA OLIVIA
2014231013**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

ABSTRACT

THE EFFECT OF SUGAR ADDITION ON THE CHARACTERISTICS OF COCOA PULP KOMBUCHA (*Theobroma cacao* L.) DURING FERMENTATION

By

CAHYA YOLA OLIVIA

This study aimed to determine the effect of sugar addition, fermentation duration, and their combination on the characteristics of cocoa pulp kombucha. The research was designed using a factorial Complete Randomized Block Design (CRBD) with two factors and three replications. The first factor was sugar addition, consisting of five levels: 5% (G₁), 6.5% (G₂), 8% (G₃), 9.5% (G₄), and 11% (G₅). The second factor was fermentation duration (F), consisting of three levels: 0 days (F₀), 7 days (F₇), and 14 days (F₁₄). The data obtained were tested for homogeneity using Bartlett's test, and additivity was tested using Tukey's test. The data were then analyzed using analysis of variance (ANOVA) to determine the effect of treatments. If significant effects were observed, further analysis was conducted using Orthogonal Polynomial tests at 5% and 1% significance levels. The results indicated that higher sugar addition levels (G₁ G₂ G₃ G₄ G₅) led to increased values of TSS, total acid, total microbes, alcohol content, sweetness, sour aroma, color, taste, aroma, and overall acceptance. However, sour taste and aftertaste values decreased. With longer fermentation durations (F₀ F₇ F₁₄), the values of TSS, sweetness, color, aftertaste, taste, and overall acceptance decreased, while total acid, sour taste, sour aroma, and aroma values increased. Additionally, total microbial counts increased from F₀ to F₇ but decreased from F₇ to F₁₄. The best treatment combination was G₅F₇ (11% sugar concentration and 7-day fermentation), with the following results: TSS 12.03°Brix, total acidity 0.48%, alcohol content 0.1668%, total microbes 8.69 log CFU/ml, sweetness 3.72 (sweet), color 3.88 (yellowish-brown), taste 5.28 (slightly liked), aroma 4.42 (neutral), color 4.90 (slightly liked), and overall acceptance 5.27 (slightly liked).

Keywords: cocoa pulp kombucha, fermentation duration, sugar addition, cocoa pulp

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK MINUMAN KOMBUCHA PULPA KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI

Oleh

CAHYA YOLA OLIVIA

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan gula dan lama fermentasi serta kombinasi keduanya terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao. Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) faktorial dengan 2 faktor dan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah penambahan gula yang terdiri dari 5 taraf yaitu 5% (G₁), 6,5% (G₂), 8% (G₃), 9,5% (G₄), 11% (G₅). Faktor kedua adalah lama fermentasi (F) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 0 hari (F₀), 7hari (F₇), dan 14 hari (F₁₄). Data yang diperoleh diuji kehomogenannya dengan uji *Barlett*, kemenambahan data diuji dengan uji *Tuckey*, kemudian data dianalisis sidik ragam untuk mengetahui pengaruh perlakuan dan apabila terdapat pengaruh nyata maka data diolah lebih lanjut dengan Polynomial Orthogonal pada taraf 5% dan 1%. Semakin tinggi penambahan gula (G₁ G₂ G₃ G₄ G₅), nilai TPT, total asam, total mikroba, kadar alkohol, rasa manis, aroma asam, warna, rasa, aroma, dan penerimaan keseluruhan semakin meningkat. Namun, nilai rasa asam dan *aftertaste* mengalami penurunan. Semakin lama fermentasi (F₀ F₇ F₁₄) dilakukan, nilai TPT, rasa manis, warna, *aftertaste*, rasa, dan penerimaan keseluruhan semakin menurun. Namun, nilai total asam, rasa asam, aroma asam, dan aroma mengalami peningkatan. Selanjutnya, nilai total mikroba pada F₀ ke F₇ mengalami peningkatan, dan pada F₇ ke F₁₄ mengalami penurunan. Perlakuan terbaik terdapat pada kombinasi perlakuan G₅F₇ (konsentrasi gula 11% fermentasi 7 hari) dengan nilai TPT 12,03°*Brix*; total asam 0,48%; kadar alkohol 0,1668%; total mikroba 8,69 log CFU/ml; rasa manis 3,72 (manis); warna 3,88 (kuning kecoklatan); rasa 5,28 (agak suka); aroma 4,42 (netral); warna 4,90 (agak suka); dan penerimaan keseluruhan 5,27 (agak suka).

Kata kunci: kombucha pulpa kakao, lama fermentasi, penambahan gula, pulpa kakao

**PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK
MINUMAN KOMBUCHA PULPA KAKAO (*Theobroma cacao* L.)
SELAMA FERMENTASI**

Oleh

**CAHYA YOLA OLIVIA
2014231013**

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA TEKNOLOGI PERTANIAN**

Pada

**Jurusan Teknologi Hasil Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2024**

Judul Skripsi : **PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK MINUMAN KOMBUCHA PULPA KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI**

Nama Mahasiswa : **Cahya Yola Olivia**

Nomor Pokok Mahasiswa : 2014231013

Program Studi : Teknologi Industri Pertanian

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Pertanian



1. Komisi Pembimbing

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

Dr. Dewi Sartika, S.T.P. M.Si.
NIP. 19701220 200812 2 001

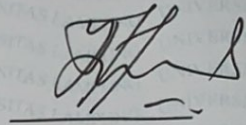
2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian

Dr. Erdi Suroso, S. T.P., M. T.A., C.EIA
NIP. 19721006 199603 1 005

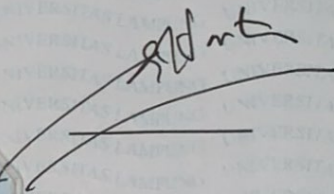
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

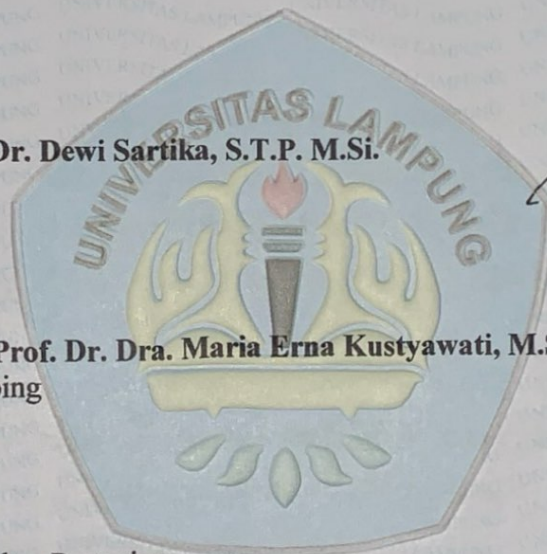
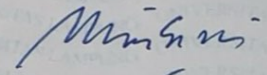
Ketua : Prof. Ir. Neti Yuliana, M. Si., Ph.D.



Sekretaris : Dr. Dewi Sartika, S.T.P. M.Si.



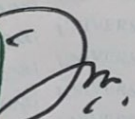
Penguji Bukan Pembimbing : Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc.



2. Dekan Fakultas Pertanian



Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIP. 19641118 198902 1 002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 24 Oktober 2024

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Cahya Yola Olivia

NPM : 2014231002

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil kerja saya sendiri yang berdasarkan pada pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain bukanlah hasil 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, 13 Oktober 2024

Pembuat pernyataan



Cahya Yola Olivia

NPM. 2014231013

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 24 Mei 2002, sebagai anak ke-2 dari pasangan Bapak Tri Hartono dan Ibu Marsuti. Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di SD Negeri 1 Gunung Terang pada tahun 2013, menyelesaikan pendidikan menengah pertama di SMP Negeri 26 Bandar Lampung pada tahun 2016, dan menyelesaikan pendidikan menengah atas di SMA Negeri 16 Bandar Lampung pada tahun 2019. Tahun 2020 penulis diterima dan terdaftar sebagai mahasiswa Prodi Teknologi Industri Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur SBMPTN (Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri).

Pada bulan Januari-Februari 2022, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Bakhu, Kecamatan Batu Ketulis, Kabupaten Lampung Barat, Provinsi Lampung. Pada bulan Juli-Agustus 2023, penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di PT New Hope Indonesia, Lampung Selatan dengan judul laporan “Mempelajari Manajemen Persediaan Bahan Baku dan Produksi Pakan Ayam di PT. New Hope Indonesia”.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam beberapa kegiatan perkuliahan. Penulis bergabung sebagai staf pada Bidang Penelitian dan Pengembangan di Koperasi Mahasiswa Unila Periode 2 2021/2022. Penulis menjadi Asisten Dosen mata kuliah Agroindustri Pati dan Turunannya (2024) dan Asisten Dosen Mikrobiologi Terapan (2024).

SANWACANA

Bismillaahirrahmanirrahiim. Alhamdulillahillobbil 'aalamiin. Puji syukur penulis ungkapkan ke hadirat Allah SWT., karena atas rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan. Skripsi dengan judul “Pengaruh Penambahan Gula Terhadap Karakteristik Minuman Kombucha Pulpa Kakao (*Theobroma cacao* L.) Selama Fermentasi” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian di Universitas Lampung. Semasa perkuliahan dan proses penulisan skripsi ini, penulis banyak menerima bantuan, bimbingan, dukungan, serta motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
3. Prof. Ir. Neti Yuliana, M. Si., Ph.D., selaku dosen pembimbing akademik serta dosen pembimbing pertama yang senantiasa membimbing, memberikan motivasi, saran, dan arahan selama perkuliahan hingga menyelesaikan skripsi.
4. Dr. Dewi Sartika, S.T.P. M.Si., selaku dosen pembimbing kedua yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan, serta saran selama penelitian hingga penyelesaian skripsi.
5. Ibu Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M. Sc., selaku dosen pembahas yang senantiasa memberikan masukan dan saran kepada penulis selama penyusunan proposal hingga penyelesaian skripsi penulis.
6. Seluruh Bapak dan Ibu dosen pengajar di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, yang telah mengajar, membimbing

dan membantu penulis selama proses perkuliahan hingga penyelesaian administrasi akademik.

7. Staf dan karyawan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung, yang telah membantu administrasi dan memfasilitasi ruangan selama proses perkuliahan hingga penyelesaian skripsi.
8. Keluarga tersayang Bapak, Mamak, Mas Yudha, Mbak Santi, serta keluarga besar saya yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, serta motivasi semangat kepada penulis hingga penyelesaian skripsi.
9. Kepada teman-teman tersayang Arneta, Mbak Mentari, Nessa, Azmut, Anek, Licha, Alfis, dan sahabat penulis lainnya yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang senantiasa membantu penulis baik secara mental maupun fisik, memberikan saran dan informasi dari awal perkuliahan hingga akhir penyelesaian skripsi ini.
10. Saudara seperjuangan Jurusan Teknologi Hasil Pertanian angkatan 2020 khususnya kelas TIP 20 dan teman satu bimbingan penulis terima kasih atas banyaknya bantuan, motivasi, saran, informasi, dan canda tawa yang telah diberikan.
11. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama perkuliahan hingga menyelesaikan skripsi.
12. *Last but not least , I wanna thank me, for believing in me, for doing all these hard work, I wanna thank me for having no days off, I for never quitting, for just being me all time.*

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak terlepas dari kekurangan dan masih jauh dari kata sempurna. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan dipergunakan sebaik-baiknya. Aamiin.

Bandar Lampung, 13 Oktober 2024

Cahya Yola Olivia

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang dan Masalah	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	4
1.4. Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Kakao.....	6
2.2. Pulpa Kakao	8
2.3. Kombucha	9
2.4. Manfaat Kombucha	10
2.5. Kultur Bakteri dan <i>Yeast</i> (SCOBY)	10
2.6. Proses Fermentasi.....	12
2.7. Standar Mutu Internasional Kombucha.....	16
III. METODE PENELITIAN	19
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2. Alat dan Bahan	19
3.3. Metode Penelitian.....	20
3.4. Pelaksanaan Penelitian	21
3.4.1. Penyiapan Pulpa Kakao Sebagai Bahan Baku Media	21
3.4.2. Persiapan	22
3.4.3. Pembuatan Kombucha Pulpa Kakao	22
3.5. Pengamatan	23

	Halaman
3.5.1. Total Padatan Terlarut (Yuliana <i>et al.</i> , 2023)	24
3.5.2. Total Asam (Yuliana <i>et al.</i> , 2023).....	24
3.5.3. Kadar Alkohol (Christopoulou <i>et al.</i> , 2003)	24
3.5.5. Total Mikroba (Yuliana <i>et al.</i> , 2023)	25
3.5.6. Uji Sensori.....	25
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1. Total Padatan Terlarut.....	30
4.2. Total Asam.....	32
4.3. Kadar Alkohol.....	33
4.4 Total Mikroba	36
4.5 Uji Sensori	38
4.5.1. Skoring.....	38
4.5.2. Hedonik.....	43
4.6. Perlakuan Terbaik.....	47
V. KESIMPULAN DAN SARAN	50
5.1. Kesimpulan.....	50
5.2. Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan nutrisi pulpa kakao.....	8
2. Mikroorganisme pada kombucha.....	11
3. Persyaratan kualitas kombucha.....	16
4. Batas kontaminan logam berat pada minuman kombucha.....	17
5. Batasan mikrobiologis untuk minuman kombucha.....	17
6. Kombinasi perlakuan penambahan gula dan lama fermentasi.....	20
7. Kuesioner uji skoring minuman kombucha pulpa kakao kloter pertama dan kedua.....	27
8. Kuesioner uji hedonik minuman kombucha pulpa kakao kloter pertama dan kedua.....	29
9. Penentuan perlakuan terbaik minuman kombucha pulpa kakao dengan penambahan gula dan lama fermentasi.....	49
10. Data total padatan terlarut kombucha pulpa kakao.....	63
11. Uji Barlett total padatan terlarut kombucha pulpa kakao.....	63
12. Analisis ragam total padatan terlarut kombucha pulpa kakao.....	64
13. Uji lanjut polinomial ortogonal total padatan terlarut kombucha pulpa kakao.....	65
14. Data total asam kombucha pulpa kakao.....	67
15. Uji Barlett total asam kombucha pulpa kakao.....	67
16. Analisis ragam total asam kombucha pulpa kakao.....	68
17. Uji lanjut polinomial ortogonal total asam kombucha pulpa kakao.....	69
18. Data kadar alkohol kombucha pulpa kakao.....	69
19. Uji Barlett kadar alkohol kombucha pulpa kakao.....	69
20. Analisis ragam kadar alkohol kombucha pulpa kakao.....	72
21. Uji lanjut polinomial ortogonal kadar alkohol kombucha pulpa kakao.....	73

	Halaman
22. Data total mikroba kombucha pulpa kakao.....	75
23. Uji Barlett total mikroba kombucha pulpa kakao	75
24. Analisis ragam total mikroba kombucha pulpa kakao	76
25. Uji lanjut polinomial total mikroba kombucha pulpa kakao.....	77
26. Data skoring rasa manis kombucha pulpa kakao	79
27. Uji Barlett skoring rasa manis kombucha pulpa kakao.....	79
28. Analisis ragam skoring rasa manis kombucha pulpa kakao.....	80
29. Uji lanjut polinomial ortogonal skoring rasa manis kombucha pulpa kakao	79
30. Data skoring rasa asam kombucha pulpa kakao	83
31. Uji Barlett skoring rasa asam kombucha pulpa kakao	83
32. Analisis ragam skoring rasa asam kombucha pulpa kakao	84
33. Uji lanjut polinomial ortogonal skoring rasa asam kombucha pulpa kakao	85
34. Data skoring aroma kombucha pulpa kakao	87
35. Uji Barlett skoring aroma kombucha pulpa kakao.....	87
36. Analisis ragam skoring aroma kombucha pulpa kakao.....	88
37. Uji lanjut polinomial ortogonal aroma kombucha pulpa kakao.....	89
38. Data skoring warna kombucha pulpa kakao	89
39. Uji Barlett skoring warna kombucha pulpa kakao	91
40. Analisis ragam skoring warna kombucha pulpa kakao.....	92
41. Uji lanjut polinomial ortogonal skoring warna kombucha pulpa kakao	93
42. Data skoring aftertaste kombucha pulpa kakao	95
43. Uji Barlett skoring aftertaste kombucha pulpa kakao	95
44. Analisis ragam skoring aftertaste kombucha pulpa kakao	96
45. Uji lanjut polinomial ortogonal skoring aftertaste kombucha pulpa kakao	97
46. Data hedonik rasa kombucha pulpa kakao.....	99
47. Uji Barlett hedonik rasa kombucha pulpa kakao	99
48. Analisis ragam hedonik rasa kombucha pulpa kakao	100
49. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik rasa kombucha pulpa kakao..	99

	Halaman
50. Data hedonik aroma kombucha pulpa kakao	103
51. Uji Barlett hedonik aroma kombucha pulpa kakao.....	103
52. Analisis ragam hedonik aroma kombucha pulpa kakao.....	104
53. Uji lanjut polinomial hedonik aroma kombucha pulpa kakao	105
54. Data hedonik warna kombucha pulpa kakao	107
55. Uji Barlett hedonik warna kombucha pulpa kakao	107
57. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik warna kombucha pulpa kakao	109
58. Data hedonik penerimaan keseluruhan kombucha pulpa kakao	111
59. Uji Barlett hedonik penerimaan keseluruhan kombucha pulpa kakao..	111
60. Analisis ragam hedonik penerimaan keseluruhan kombucha pulpa kakao	112
61. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik penerimaan keseluruhan kombucha pulpa kakao	113

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman kakao	7
2. Buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa	7
3. Rute fermentasi kombucha.....	13
4. Diagram alir penyiapan pulpa kakao sebagai bahan baku media	21
5. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao.....	23
6. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap	31
7. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap	32
8. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap kadar alkohol	34
9. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap total mikroba	36
10. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap rasa.....	39
11. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap rasa asam kombucha pulpa kakao	40
12. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap aroma	41
13. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap warna	42
14. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap aftertaste.....	43
15. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap rasa.....	44
16. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap	45
17. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap warna	46
18. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap	46
19. Proses pembuatan minuman kombucha pulpa kakao	115
20. Pengujian total mikroba	116
21. Pengujian total padatan terlarut.....	116
22. Pengujian total asam	117
23. Pengujian kadar alkohol.....	117
24. Pengujian sensori	117

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang dan Masalah

Tanaman kakao atau yang memiliki nama ilmiah (*Theobroma cacao* L.) termasuk dalam famili *Sterculiaceae* yang berasal dari Amerika Selatan dan tumbuh di daerah hutan tropis (Farhanandi dan Indah, 2022). Indonesia menduduki peringkat ketiga sebagai negara penghasil kakao terbesar di dunia (Ditjenbun, 2022). Berdasarkan data statistik Ditjenbun (2023), total produksi kakao di Indonesia sebanyak 692.168 ton. Luas perkebunan kakao di Indonesia pada tahun 2023 didominasi oleh perkebunan rakyat seluas 1.381.530 hektar, kemudian luas perkebunan besar negara 642 hektar, dan luas perkebunan swasta 7.822 hektar. Pengolahan kakao memiliki hasil samping yang kurang diperhatikan oleh masyarakat dan cenderung dianggap limbah yaitu pulpa. Biji kakao yang diolah menjadi biji kering menghasilkan limbah cangkang dan pulpa yang melapisi permukaan biji (Rahmawasih, 2016). Pemanfaatan pulpa kakao masih belum banyak dilakukan karena minimnya pengetahuan masyarakat mengenai pengolahan lebih lanjut pada pulpa biji kakao (Nurfaillah dkk., 2018).

Pulpa kakao mengandung berbagai nutrisi diantaranya 80-90% air, 2,13-21,4% glukosa, 1,06-4,42% fruktosa, 2,13-4,06% sukrosa, 1,5-2,8% serat, 5-7% pektin, 0,1-0,5% protein, 0,2-0,3% abu (Nurfaillah dkk., 2018; Kementan, 2019; Yuliana dkk., 2022). Pulpa kakao juga mengandung beberapa mineral yakni kalium 1459,842 mg/kg, magnesium 237,230 mg/kg, kalsium 13,343 mg/kg dan nilai pH 3,5 (Nunes *et al.*, 2020). Berdasarkan komposisi-komposisi tersebut, pulpa kakao dapat dijadikan sebagai bahan baku pembuatan produk fermentasi seperti kombucha, nata de kakao, cuka, dan lain-lain (Yuliana dkk., 2022).

Salah satu pemanfaatan pulpa kakao yaitu dapat dijadikan minuman kesehatan kombucha. Salah satu minuman teh tradisional hasil fermentasi menggunakan inokulum *yeast* dan bakteri SCOBY (*Symbiotic Culture of Bactery and Yeast*) disebut kombucha (Filippis *et al.*, 2018). Penelitian tentang pembuatan minuman kombucha dari pulpa kakao pertama kali dilakukan oleh Yuliana dkk. (2019). Kemudian penelitian lain tentang kombucha pulpa kakao dilakukan oleh Rahayu (2022) dan Wibowo (2023), yang membahas tentang pengaruh variasi waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan dan karakteristik fisiko-kimia kombucha pulpa kakao.

Menurut Villarreal-Soto *et al.* (2018), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi fermentasi kombucha diantaranya, pH, substrat (gula), dan waktu fermentasi. Mikroba membutuhkan substrat sebagai sumber karbon dan sumber energi bagi kehidupannya (Waluyo, 2005). Mengutip penelitian Wibowo (2023) cairan pulpa kakao memiliki total padatan terlarut sekitar 11°Brix-18°Brix, kandungan gula ini dimanfaatkan untuk mendukung nutrisi mikroba pada fermentasi kombucha. Bakteri yang terlibat dalam proses produksi kombucha diantaranya *Acetobacter xylinum*, sementara khamir yang terlibat berasal dari beberapa spesies dalam genus *Brettanomyces*, *Zyhosaccharomyces*, dan *Saccharosmyces* (Suhardini dan Zubaidah, 2016). Bakteri *Acetobacter xylinum* dapat tumbuh pada pH 3,5-7,5 yang termasuk golongan asidofilik, namun pH optimal pertumbuhannya berkisar 4,3-5,5 (Lehninger, 1994; dan Lapuz *et al.*, 1969).

Pulpa kakao memiliki pH sangat rendah yaitu 2-4,5 (Abubakar dkk., 2022; Patty, 2019; Yunianta, 2010), sehingga terlalu rendah atau asam apabila langsung digunakan sebagai media fermentasi sehingga diperlukan pengenceran. Penelitian yang dilakukan Natalingsih (2019), menunjukkan pembuatan nata dari pulpa kakao tanpa pengenceran tidak menghasilkan nata, karena pulpa kakao memiliki tingkat keasaman yang tinggi yang mengakibatkan tidak terbentuknya nata. Namun, pengenceran pulpa menyebabkan kandungan gula yang terdapat pada pulpa kakao menurun. Penurunan kandungan gula akan berpengaruh pada

pertumbuhan mikroba. Oleh karena itu, diperlukan penambahan gula pada pembuatan kombucha pulpa kakao.

Pada penelitian yang dilakukan Kurniawan dkk. (2017), dalam pembuatan minuman teh kombucha daun gambir diberi penambahan gula sebanyak (6, 8, 10, dan 12)%, dan minuman teh kombucha daun gambir terbaik yang didapat pada perlakuan gula 12%. Penelitian yang dilakukan Naufal dkk. (2022), pada pembuatan minuman kombucha kulit buah naga diberi penambahan gula sebanyak (5, 10, dan 15)%, dan kombucha yang paling disukai oleh panelis yaitu perlakuan gula 10%. Kemudian pada penelitian Cohen *et al.* (2023), pembuatan kombucha dari teh hitam diberi penambahan gula sebanyak (5, 7.5, dan 10)%, dan hasil kombucha yang disukai panelis ialah perlakuan gula 7,5% dan 10%. Sejalan dengan pernyataan Nyhan *et al.* (2022), yaitu terdapat kesepakatan umum bahwa konsentrasi gula yang ideal berada pada kisaran 5-10% b/v.

Proses fermentasi pembuatan minuman kombucha biasanya dilakukan selama kurang lebih 7-14 hari (Nyhan *et al.*, 2022). Vohra *et al.* (2019), melaporkan peningkatan aktivitas antioksidan minuman kombucha terjadi selama 7 hari pertama fermentasi oleh biotransformasi fitokimia menjadi polifenol oleh enzim yang disekresikan oleh kultur kombucha. Hal serupa dihasilkan oleh penelitian Zofia *et al.* (2020), dimana efek antioksidan kombucha paling tinggi pada hari ke 14 fermentasi namun secara signifikan lebih rendah pada hari ke 28. Selain itu, kombucha yang difermentasi selama 14 hari terbukti kurang bersifat sitotoksik terhadap sel kulit dibandingkan minuman yang difermentasi selama 28 hari. Karakteristik minuman kombucha pulpa kakao berdasarkan penelitian yang dilakukan Yuliana dkk. (2019), selama fermentasi 8 hari memiliki karakteristik yaitu total mikroba ($\log 14,99$ CFU/mL), bioselulosa (3,17 g), pH akhir (2,97), keasaman asam asetat (6,14%), TSS (11,00 °brix), total fenolik (117,80 mgGAE/mL), total flavonoid 1,70 mgQAE/mL), dan memiliki warna coklat agak jernih. Kemudian pada penelitian Wibowo (2023), kombucha pulpa kakao yang difermentasi selama 14 hari memiliki total fenol tertinggi sebesar (4,13mgGAE/gr), aktivitas antioksidan terbaik sebesar (89,12 %), pH sebesar (3,33), total gula sebesar (4,61 %).

Pengaruh penambahan gula pada media cairan pulpa kakao yang telah diencerkan dan lama fermentasi kombucha pulpa kakao belum diketahui titik optimalnya. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan minuman kombucha pulpa kakao dengan karakteristik terbaik melalui kondisi fermentasi (penambahan gula dan lama fermentasi) yang sesuai agar menghasilkan karakteristik minuman kombucha pulpa kakao terbaik.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh penambahan gula terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao.
2. Mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao.
3. Mengetahui pengaruh kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi yang menghasilkan karakteristik terbaik minuman kombucha pulpa kakao.

1.3. Kerangka Pemikiran

Permasalahan pada pengolahan pulpa kakao menjadi kombucha adalah pH yang terlalu asam. Hal ini sejalan dengan penelitian Yuniarta (2010), limbah cair kakao sebelum dilakukan perlakuan memiliki pH 3,5. Kadar pH yang terlalu rendah (asam) atau terlalu tinggi (basa) dapat menyebabkan tingkat kematian mikroba yang tinggi. Tingkat kematian yang tinggi akan mempengaruhi laju fermentasi, karena jumlah mikroba dalam proses penguraian glukosa menjadi etanol berkurang (Taslim dkk., 2017). Maka dari itu diperlukan perlakuan pengenceran untuk mengurangi kadar pH pada pulpa.

Perlakuan pengenceran pulpa dapat dilakukan dengan menambahkan air untuk merubah keasaman (pH) pulpa kakao. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Natalingsih (2019), pembuatan nata dari pulpa kakao tanpa proses pengenceran atau penambahan air tidak menghasilkan nata. Hal ini disebabkan oleh tingkat

keasaman yang tinggi pada pulpa kakao (pH 3), yang mengakibatkan ketidakmampuan terbentuknya nata. Namun, pada penelitian Dewayani dan Syamsuri. (2019), pengenceran mengakibatkan berkurangnya kandungan yang ada pada pulpa seperti gula, warna dan senyawa nutrisi untuk pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu, perlu penambahan gula agar mikroba memiliki nutrisi yang cukup untuk pertumbuhannya.

Hasil dari penelitian-penelitian terdahulu yang dilakukan Kurniawan dkk. (2017), Naufal dkk. (2022), Cohen *et al.* (2023), dan Nyhan *et al.* (2022), menunjukkan bahwa perlakuan penambahan gula berpengaruh terhadap karakteristik minuman kombucha. Merujuk pada penelitian-penelitian sebelumnya, maka pada penelitian ini dilakukan penambahan gula (5%, 6,5%, 8%, 9,5%, dan 11%). Pada pembuatan minuman kombucha, lama fermentasi dapat mempengaruhi kualitas fisika, kimia, dan organoleptik dari sediaan kombucha yang dihasilkan (Wistiana dan Zubaidah, 2015). Berdasarkan penelitian Wibowo (2023), Vohra *et al.* (2019), dan Zofia *et al.* (2020), fermentasi pembuatan minuman kombucha dilakukan selama 7-14 hari, dan telah mendapatkan hasil informasi kombucha terbaik. Berdasarkan penelitian-penelitian diatas maka pada penelitian ini akan dilakukan fermentasi selama 7 dan 14 hari, dan untuk mengetahui efek penambahan gula terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao maka akan dilakukan analisis terhadap uji pH, uji total padatan terlarut, uji total asam, uji kadar alkohol, uji total mikroba, dan uji sensori.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penambahan gula berpengaruh nyata terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao.
2. Lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao.
3. Kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi menghasilkan karakteristik terbaik minuman kombucha pulpa kakao.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kakao

Kakao merupakan tanaman yang memiliki nama ilmiah *Theobroma cacao* L. Tanaman kakao (Gambar 1) termasuk dalam famili *Sterculiaceae* yang berasal dari Amerika Selatan dan saat ini sudah banyak ditanam di berbagai kawasan tropika (Farhanandi dan Indah, 2022). Tanaman kakao memiliki tinggi yang berkisar antara 4-8 m. Biji dari kakao ini dapat diolah menjadi produk kakao dan coklat (Riono, 2020). Berdasarkan klasifikasi botani, sistematika kakao adalah sebagai berikut.

Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub-divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Malvales
Famili : Sterculiaceae
Genus : *Theobroma*
Spesies : *Theobroma cacao* (Sugiharti, 2016).

Tanaman kakao termasuk dalam kategori tanaman tahunan yang termasuk dalam kelompok caulifloris, yang berarti tanaman ini berbunga dan berbuah langsung pada batang dan cabangnya. Secara umum, tanaman ini dapat dibagi menjadi dua bagian, yakni bagian vegetatif yang mencakup akar, batang, dan daun, serta bagian generatif yang melibatkan bunga dan buah. Benih kakao termasuk dalam kategori benih rekalsitran, yang artinya benih tersebut tidak tahan terhadap pengeringan, rentan terhadap perubahan suhu dan kelembaban rendah, memiliki

daya simpan yang rendah, dan sensitif terhadap perubahan lingkungan penyimpanan (Lukito *et al.*, 2010).



Gambar 1. Tanaman kakao
Sumber: Dokumentasi pribadi

Tanaman kakao terdiri dari 3 varietas yaitu *criollo*, *forastero*, dan *trinitario*. Kakao *criollo* juga dikenal sebagai edel atau kakao mulia yang memiliki ciri fisik buah kecil, berwarna merah, biji tidak berwarna dan beraroma khas. Tanaman kakao jenis *forastero* memiliki ciri fisik kulit berwarna kuning, biji berwarna ungu, aroma tidak setajam *criollo*. Kakao *trinitario* hasil persilangan dari *criollo* dan *forastero* dengan ciri fisik buahnya memanjang, kulit berwarna kuning atau merah dengan lima lekukan ganda (Khoidir, 2023). Buah kakao yang masak berisi sekitar 30-40 biji yang terbungkus oleh lapisan lendir berwarna putih (Murugan dan Al-Sohaibani, 2012), seperti yang disajikan pada Gambar 2. 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.



Gambar 2. Buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa
Sumber: Dokumentasi pribadi

2.2. Pulpa Kakao

Pada proses pengolahan biji kakao akan menghasilkan cairan yang disebut pulpa kakao. Pulpa kakao merupakan lapisan lendir berwarna putih atau kuning pucat yang menyelimuti permukaan biji kakao, terdapat sekitar 3-5% dari total berat biji. Pulpa adalah bagian tebal dari endosperm dan terdiri dari sel-sel yang berbentuk turbuler dengan ruang antar sel yang luas (Murugan dan Al-Sohaibani, 2012; Figueroa *et al.*, 2020; Scheuer, 2020). Pulpa kakao juga mengandung senyawa polifenol yang merupakan senyawa antioksidan yang bermanfaat bagi kesehatan manusia (Miranda dkk., 2019). Adapun kandungan nutrisi pulpa kakao disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan nutrisi pulpa kakao

No	Parameter	Kandungan rata-rata
1	Air (%)	80-86***
2	Glukosa (%)	2,13-21,4***
3	Fruktosa (%)	1,06-4,42***
4	Sukrosa (%)	2,13-4,06***
5	Karbohidrat (%)	19,50**
6	Lemak (%)	1,45**
7	Protein (%)	0,62**
8	pH	3,50**
9	Kalsium (mg/L)	171,5*
10	Magnesium (mg/L)	82,5*
11	Fosfor (mg/L)	62,47*
12	Pektin	0,51**

Sumber: *Anvoh *et al.*, (2009); **Nunes *et al.*, (2020); ***Yuliana dkk., (2022)

Kandungan pulpa kakao yang kaya akan karbohidrat dapat dijadikan sebagai media fermentasi (Yuliana dkk., 2022). Pulpa kakao dapat diolah menjadi berbagai macam produk fermentasi diantaranya nata de kakao (Nurfaiillah dkk., 2018), kombucha pulpa kakao (Yuliana dkk., 2019), bioherbisida gulma belulang (Safitri, 2019), cuka kakao (Adrista dkk., 2016). Pulpa yang tidak ditangani dengan benar akan difermentasi oleh mikroorganisme dan dapat menimbulkan penyakit. Selain menimbulkan penyakit, pulpa kakao menyebabkan pencemaran udara akibat timbulnya bau asam yang disebabkan oleh aktivitas mikroba yang menghasilkan gas ammonia (Indriani, 2004).

2.3. Kombucha

Kombucha merupakan salah satu minuman tradisional yang berasal dari timur laut Tiongkok masa Dinasti Tsin 220 SM (Zou *et al.*, 2021). Kombucha mulai dikenal setelah dibawa ke Jepang dan menyebar ke seluruh dunia melalui jalur perdagangan (Abaci *et al.*, 2022). Minuman kombucha merupakan hasil fermentasi yang dilakukan oleh kultur simbiotik (Fillippis *et al.*, 2018). Rinihapsari (2008), menjelaskan bahwa kombucha merupakan minuman yang dihasilkan dari fermentasi campuran teh dan gula dengan bantuan kultur kombucha, yang terdiri dari beberapa jenis mikroorganisme seperti (*Acetobacter aceti* dan beberapa jenis khamir). Meskipun bahan utama kombucha umumnya menggunakan daun teh hitam, teh hijau atau teh oolong, minuman ini juga dapat diciptakan melalui *infused water* dengan menggunakan buah-buahan, daun mint, bunga melati, dan lainnya (Leal *et al.*, 2018). Menurut Watawana *et al.* (2015), kultur kombucha dikenal juga sebagai SCOBY (*Symbiotic Culture of Bactery and Yeast*). Pada penelitian Rahayu (2022), dilakukan waktu fermentasi kombucha pulpa kakao selama 14 hari, dan dihasilkan kombucha pulpa kakao terbaik yaitu fermentasi 3 hari dengan aktivitas antioksidan yang baik. Kemudian pada penelitian Wibowo (2023), fermentasi kombucha pulpa kakao dilakukan selama 12 hari, dan dihasilkan kombucha dengan kondisi optimum yaitu pada fermentasi 4 hari.

Pada penelitian yang dilakukan Yuniarta (2010), dalam pembuatan nata de kakao dilakukan pengenceran pulpa:air (3:1, 1:1, dan 1:3), dan perlakuan terbaik (rendemen dan sifat sensori) diperoleh dengan pengenceran media 1:3. Hal ini sejalan dengan penelitian Dewayani dan Syamsuri. (2019), pada pembuatan nata de kakao dilakukan pengenceran pulpa:air (1:3, 1:6, 1: 9, dan 1:12) lapisan nata yang paling tebal didapat pada perlakuan pengenceran perbandingan 1:3. Sedangkan perlakuan terbaik yang disukai panelis adalah pengenceran 1:12. Selanjutnya, pada penelitian Pawaskar *et al.* (2020), dilakukan perlakuan pengenceran (1:0, 1:0,5, 1:1, 1:1,5, dan 1:2) pembuatan anggur dari sari buah kokum untuk mengurangi warna dan keasaman sari buah kokum.

2.4. Manfaat Kombucha

Pemanfaatan kombucha sebagai minuman suplemen makanan dan pencegah berbagai penyakit telah lama diterapkan di beberapa negara Asia. Kultur mikroorganisme dalam kombucha terdiri dari jenis mikroorganisme non-patogen yang tidak menyebabkan gangguan penyakit. Bahkan, hasil fermentasi menghasilkan senyawa antibakteri yang memiliki potensi melawan bakteri patogen (Naland, 2004). Teh kombucha dianggap sebagai minuman fungsional yang berada di antara kategori minuman konvensional dan obat, memiliki potensi untuk digunakan dalam upaya pencegahan penyakit (Jayabalan *et al.*, 2007). Menurut Suhirman (2012), meskipun teh kombucha tidak bersifat penyembuh untuk semua penyakit, tetapi dapat meningkatkan kesehatan dan daya tahan tubuh. Teh kombucha dapat dianggap sebagai minuman fungsional karena memberikan dampak positif terhadap kesehatan dan kebugaran tubuh. Proses fermentasi teh kombucha menghasilkan berbagai asam organik seperti asam asetat, asam folat, asam glukoronat, asam glukonat, asam laktat, asam malat, asam amino esensial, vitamin B, vitamin C, dan mineral. Komponen-komponen ini berkontribusi pada kesehatan tubuh dengan menstabilkan metabolisme, membantu menurunkan berat badan, menormalkan fungsi organ tubuh, mencegah kanker, dan meningkatkan daya tahan tubuh (Suhirman, 2012).

2.5. Kultur Bakteri dan *Yeast* (SCOBY)

Fermentasi kombucha melibatkan berbagai jenis mikroorganisme, yaitu konsorsium antara bakteri dan khamir yang disebut SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). SCOBY adalah simbiosis dari kultur bakteri asam asetat (*Komagataeibacter*, *Glucanobacter*, *Acetobacter*), bakteri asam laktat (*Lactobacillus*, *Lactococcus*), dan khamir (*Saccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, dan *Torulasporea delbrueckii*). Medium fermentasi yang biasa digunakan adalah teh, terutama teh hitam yang sudah dipermanis (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

SCOBY terbentuk sebagai lapisan selulosa berwarna putih di permukaan larutan teh dan dikenal sebagai biofilm. Ukuran SCOBY menyesuaikan diameter wadah fermentasi. Mikroorganisme seperti *Acetobacter* menghasilkan selulosa, di mana spesies *Acetobacter* direklarifikasi sebagai *Gluconacetobacter xylinus* dan kemudian menjadi *Komagataeibacter xylinus* (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Aktivitas biokimia bakteri ini mengubah glukosa menjadi asam glukonat di fase cair, sementara proses metabolisme lainnya menghasilkan biofilm selulosa di permukaan cairan (Zubaidah dkk., 2022).

Menurut penelitian Marsh *et al.* (2014) dan Watawana *et al.* (2016) dalam Villarreal-Soto *et al.* (2018), *Gluconacetobacter* mendominasi sekitar 86% dari mikroba pada media cairan dan biofilm. Selama fermentasi, spesies utama yang aktif antara lain *A. xylinum*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *K. xylinus*, dan *Gluconobacter xylinus*. Khamir yang ditemukan dalam kombucha mencakup *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis delbrueckii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Candida tropicalis*, dan *Zygosaccharomyces bailii*. Selain khamir, kombucha juga mengandung bakteri asam laktat, seperti *Lactobacillus sp.*, yang dominan pada tahap akhir fermentasi. Beberapa bakteri asam laktat lainnya dalam kombucha adalah *Lactobacillus kefiranofaciens subsp. kefirgranum*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus lutiensis*, *Streptococcus bovis*, *Brevibacterium sp.*, dan *Lactobacillus plantarum*.

Tabel 2. Mikroorganisme dan perannya dalam proses fermentasi kombucha

Mikroorganisme	Spesies	Peran dalam Fermentasi
<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter xylinum</i>	Memproduksi asam asetat dan asam glukuronat.
	<i>Acetobacter xylinoides</i>	
	<i>Acetobacter ketogenum</i>	Membentuk serat-serat selulosa/nata.
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>	Menguraikan sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa, memproduksi alkohol dan CO ₂ .
	<i>Saccharomyces ludwigii</i>	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Saccharomyces apiculatus</i>	
	<i>Zygosaccharomyces kombuhae</i>	
	<i>Brettanomyces</i>	

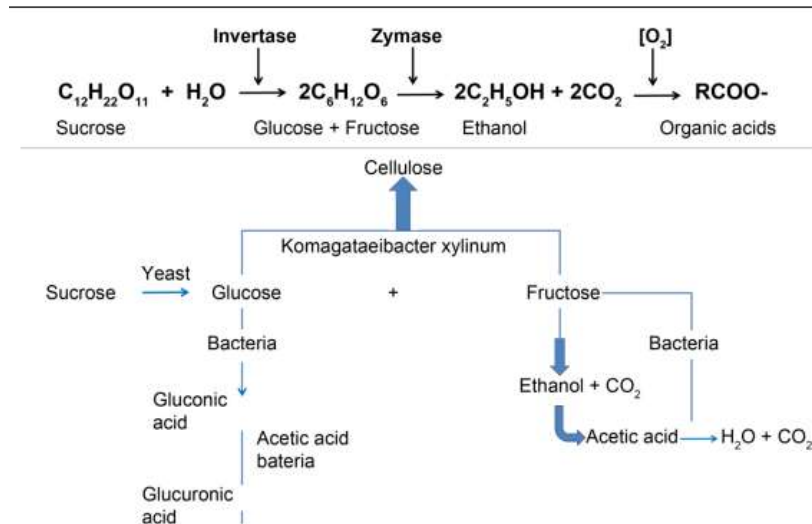
Mikroorganisme	Spesies	Peran dalam Fermentasi
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	Memproduksi asam laktat.
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus spp.</i>	Memproduksi asam laktat.
<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconobacter kombucha</i>	Memproduksi asam asetat. Membentuk serat-serat selulosa/nata.

Sumber: Zubaidah dkk. (2022)

2.6. Proses Fermentasi

Fermentasi sebagai metode pengolahan makanan yang telah diterapkan secara tradisional mencakup berbagai skala mulai dari rumah tangga hingga industri. Proses ini melibatkan konversi metabolik substrat mentah menjadi makanan yang mengalami peningkatan kualitas dengan memanfaatkan aktivitas metabolisme mikroba untuk menstabilkan dan mentransformasi bahan pangan menjadi produk yang layak konsumsi dengan nilai yang ditingkatkan. Fermentasi menghasilkan metabolit antimikroba, bakteriosin, dan sintesis asam organik yang dapat menghambat pertumbuhan patogen. Tujuan utama dari fermentasi melibatkan peningkatan umur simpan produk, peningkatan manfaat kesehatan, perbaikan karakteristik organoleptik seperti aroma, rasa, dan tekstur, serta penghambatan mikroba yang tidak diinginkan dan penghilangan toksisitas dari makanan sehingga 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 mengalami hidrolisis oleh *yeast* melalui invertase dalam kondisi anaerob, menghasilkan fruktosa dan glukosa. Selanjutnya, *yeast* mengubah glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida. Proses ini diikuti oleh *Lactobacillus* yang mengubah glukosa menjadi asam laktat, sementara *Acetobacteria* dalam kondisi aerob mengonversi etanol menjadi asam asetat dan air. Rute fermentasi utama kombucha menghasilkan produk seperti etanol, asam asetat, asam glukonat, dan asam glukoronat (Jakubczyk *et al.*, 2022; Zailani dan Adnan, 2022). Aktivitas metabolisme kombucha ditunjukkan secara skematis pada Gambar 3.



Gambar 3. Rute fermentasi kombucha
 Sumber: Massoud *et al.* (2022)

Produk akhir dari setiap proses fermentasi akan bervariasi, dan perbedaan hasil fermentasi dari substrat yang sama dipengaruhi oleh variasi bahan seperti jenis wadah fermentasi, keberadaan *Lactobacilli*, penggunaan garam, bumbu dan rempah, jenis starter atau kultur, kandungan gula, dan durasi waktu fermentasi (Jeanroy dan Wasserman, 2019). Faktor-faktor yang mempengaruhi fermentasi kombucha adalah sebagai berikut:

a. Substrat

Kombucha memiliki beragam substrat yang dapat digunakan, seperti teh hijau, teh hitam, teh oolong, ekstrak umbi, anggur, susu, jus buah, dan infus tanaman. Kombucha yang berasal dari substrat teh perlu disisipi dengan sukrosa sebanyak 50 g/L air untuk menjadi substrat fermentasi bagi *yeast*. *Yeast* akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dengan bantuan enzim invertase, kemudian mengubahnya menjadi etanol, karbon dioksida, dan gliserol. Etanol yang dihasilkan oleh bakteri asam asetat akan diubah menjadi asam asetat (Bishop *et al.*, 2022).

b. Starter

Penggunaan kultur starter telah meningkatkan efisiensi proses produksi, meningkatkan hasil produk, dan menjaga konsistensi sifat organoleptik produk. Sebagian besar ciri khas dari proses fermentasi bergantung pada jenis mikroorganisme yang terlibat (Sun *et al.*, 2014). Mikroorganisme yang

memainkan peran penting dalam proses fermentasi melibatkan sekelompok bakteri dan *yeast* yang bekerja secara simbiotik. Contohnya, golongan *Acetobacter* seperti *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter aceti*, *Brettanomyces sp.*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Torulopsis sp.*, *Zygosaccharomyces bailii*; *Schizosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulasporea*, *Candida* (Watawana *et al.*, 2015; Suhardini dan Zubaidah, 2016).

c. Gula

Gula berperan sebagai sumber energi bagi mikroorganisme selama proses fermentasi dan berkontribusi dalam pembentukan lapisan selulosa (Pothakos *et al.*, 2016). Variasi konsentrasi gula dalam fermentasi dapat memengaruhi produk akhir yang dihasilkan. Menurut penelitian Handoko (2020), kombucha teh herbal buah mangrove dengan penambahan gula sebanyak 10% dan difermentasi selama 14 hari menghasilkan fenolik total sebesar 19.679,82 mg GAE/100g dan nilai IC50 sebesar 33,95 ppm, sementara sensori menunjukkan tingkat penerimaan yang lebih baik dibandingkan dengan kombucha yang menggunakan penambahan gula 20% dan 30%. Temuan lain juga menunjukkan bahwa jus murbei dengan berbagai tingkat brix menghasilkan total fenol yang berbeda, dengan jus murbei 14 °brix yang difermentasi selama 48 jam mencapai total fenol tertinggi sebesar 928,12±3,05 mg/100 ml (Kwaw *et al.*, 2017).

d. Waktu Fermentasi

Lamanya waktu fermentasi memiliki dampak pada produksi metabolit, jenis dan konsentrasi nutrisi, serta aroma. Fermentasi kombucha dalam rentang 6-10 hari menghasilkan minuman yang menyegarkan. Namun, fermentasi yang berlangsung lebih dari 10 hari dapat menghasilkan minuman yang tidak enak dan mengandung asam organik berbahaya, meskipun konsentrasi antioksidannya lebih tinggi (Bishop *et al.*, 2022). Penelitian oleh Hassmy *et al.* (2017), menunjukkan bahwa kombucha teh hijau yang difermentasi selama 1 hingga 5 hari menghasilkan pH dan antioksidan yang aman untuk dikonsumsi. Sebaliknya, penelitian oleh Zofia *et al.* (2020), menyatakan bahwa kombucha kopi biji hijau yang difermentasi selama 14 hari memiliki aktivitas antioksidan

SOD yang lebih tinggi, berfungsi sebagai anti-penuaan, sedangkan fermentasi selama 28 hari hanya meningkatkan total fenol dan total flavonoid.

e. Suhu

Mikroba dan bakteri memiliki suhu pertumbuhan dengan nilai minimal, maksimal, dan optimal (Cheng *et al.*, 2016). Suhu optimal dalam proses fermentasi menjadi kritis untuk mencapai kondisi ideal mikroba dan aktivitas enzimatis, yang pada gilirannya menghasilkan produk terbaik (Hur *et al.*, 2014). Untuk fermentasi kombucha, suhu yang ideal berada dalam kisaran 22°C hingga 30°C (Vitas *et al.*, 2013). Suhu fermentasi yang melebihi batas tertentu dapat mengakibatkan peningkatan konsentrasi etanol dan asam asetat sehingga produk tersebut tidak dapat dikonsumsi secara optimal (Crum dan Lagory, 2016).

f. pH

Dalam proses fermentasi kombucha, pH memiliki dampak signifikan pada laju pertumbuhan mikroba dan perubahan struktural fitokimia yang dapat memengaruhi aktivitas antioksidan (Hur *et al.*, 2014). Bakteri memerlukan kondisi pH antara 3,5-5,5 agar dapat berkembang dengan optimal (Ganjar dan Samsul, 2016). Pada saat titrasi keasaman mencapai konsentrasi ideal sekitar 4 hingga 5 g/L, proses fermentasi perlu dihentikan (Villarreal-Soto *et al.*, 2018).

g. Sanitasi

Kebersihan peralatan kaca dan *stainless steel* serta lingkungan fermentasi kombucha memiliki peran yang sangat signifikan dalam mencegah terjadinya fermentasi yang tidak baik (Leal *et al.*, 2018). Praktik sanitasi ini juga dimaksudkan untuk menghindari pertumbuhan bakteri berbahaya. Upaya sanitasi melibatkan metode seperti pasteurisasi, pendinginan, dan penggunaan bahan pengawet. Industri menggunakan natrium benzoat dan kalium benzoat untuk mencegah *yeast* dan bakteri menghasilkan alkohol dan karbon dioksida setelah proses pengemasan (Watawana *et al.*, 2015).

h. Air

Kualitas air dalam proses fermentasi perlu bebas dari kontaminasi, karena memiliki dampak signifikan pada rasa kombucha dan kondisi SCOBY selama fermentasi. Air berfungsi sebagai medium pertumbuhan awal bagi *yeast* dan

bakteri sebelum dimulainya proses fermentasi dan faktor ini tergantung pada sumber serta lokasi air seperti air sumur, mata air, atau air kota, beserta mineral dan komposisi organiknya (Crum dan Lagory, 2016; Tran *et al.*, 2020). Air sumur yang tidak mengandung klorin atau fluorida dapat memiliki mineral seperti bikarbonat, besi, dan magnesium yang dapat memberikan dampak negatif pada rasa kombucha. Sementara air kota diolah dengan klorin atau fluorida untuk keamanan konsumsi dan sifat antimikrobanya, penggunaan air ini dapat menghambat kemampuan SCOBY untuk fermentasi dan menghasilkan senyawa rasa sehingga diperlukan sistem penyaringan dengan karbon aktif dan lampu UV untuk mendisinfeksi air dan mencegah kontaminasi (Palmer, 2013; Crum dan Lagory, 2016).

2.7. Standar Mutu Internasional Kombucha

Menurut Draft Uganda Standard (2022), kombucha harus memenuhi persyaratan kualitas khusus yang ditentukan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Persyaratan kualitas kombucha

Karakteristik		Persyaratan	Metode pengujian
Kandungan alkohol, % (v/v)	Kombucha tidak beralkohol	$\leq 0,5$	US EAS 104
	Kombucha alkohol ringan	0,5 – 5,9	
	Kombucha alkohol kuat	6 - 12	
pH max	4,5		
Keasaman sebagai asam asetat, g/L max	20		
Total gula sebagai gula invert, g/L max	50		

Bahan tambahan makanan setiap kali digunakan dalam produksi kombucha harus sesuai dengan *The U.S Department of Agriculture (USDA) 45*. Produk tidak boleh mengandung kontaminan logam berat melebihi batas yang ditentukan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Batas kontaminan logam berat pada minuman kombucha

Kontaminan	Batas maksimum	Metode pengujian
<i>Arsenic (As)</i> , mg/kg	0,05	US ISO 6634
<i>Lead (Pb)</i> , mg/kg	0,05	US ISO 6633
<i>Mercury (Hg)</i> , mg/kg	0,001	US ISO 6637
<i>Cadmium (Cd)</i> , mg/kg	0,003	US ISO 6561-2

Minuman kombucha harus diproduksi dan ditangani dengan cara yang higienis sesuai dengan US EAS 39. Minuman kombucha harus sesuai dengan batas kontaminan mikrobiologis pada Tabel 5.

Tabel 5. Batasan mikrobiologis untuk minuman kombucha

Mikroorganisme	Batas maksimum	Metode pengujian
<i>Escherichia coli</i> , per mL	Absent	US ISO 7251
<i>Staphylococcus aureus</i> , CFU/mL	Absent	US ISO 6888-1
<i>Salmonella</i>	Absent	US ISO 6579-1

Klaim gizi dan kesehatan harus dibuat sesuai dengan US EAS 803 dan US EAS 805. Wadah harus diberi label sesuai dengan persyaratan US EAS 38. Selain itu, hal-hal berikut harus diberi label dengan jelas dan tidak terhapuskan pada wadah:

- a) Nama produk sebagai "Kombucha Non-alkohol" atau "Kombucha Beralkohol" berdasarkan jenis sesuai dengan klausul 4 dan kategori berdasarkan kandungan alkohol sesuai dengan Tabel 3.
- b) Nama merek.
- c) Isi bersih dalam milimeter atau liter.
- d) Kandungan alkohol etil, % volume pada saat pengemasan/pembotolan.
- e) Nama, lokasi fisik, dan alamat produsen/perorang impor/pembotol.
- f) Nomor batch, kode identifikasi nomor batch.
- g) Tanggal pembuatan/pembotolan dan tanggal kedaluwarsa produk.
- h) Petunjuk penyimpanan dan penanganan higienis produk.
- i) Daftar bahan-bahan dalam urutan menurun berdasarkan proporsi massa.
- j) Peringatan wajib.
- k) Petunjuk penyimpanan.
- l) Pernyataan "Tidak untuk dijual kepada orang di bawah 18 tahun" untuk Kombucha beralkohol.
- m) Negara asal.

- n) Kombucha yang mengandung lebih dari 200 mg/L kafein harus mencantumkan kata "berkafein" atau "mengandung kafein" sebelum nama produk.
- o) Kombucha yang mengandung lebih dari 200 mg/L kafein harus menunjukkan jumlah kafein dalam minuman saat dikonsumsi dalam mg/L.

Kemudian standar kualitas kombucha di negara Brazil diatur oleh Instruksi Normatif (IN) No. 41 tanggal 17 September 2019, Kementerian Pertanian, Peternakan, dan Pasokan (MAPA). Standar kualitas kombucha meliputi pH dalam rentang (2,5–4,2), kadar alkohol kombucha tanpa alkohol (0,5%) dan dengan alkohol (0,6–0,8%), keasaman volatile (30–130 mEq/L), dan tekanan (atm 20°C) pada kombucha yang ditambahkan dengan CO₂ (1,1 hingga 3,9 atm) (Brasil, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Kimia Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Pengelolaan Limbah Agroindustri, Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, dan Analisis Sensori Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan pada Mei 2024 – Juli 2024.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain timbangan digital, baskom, kompor gas, kompor listrik, panci, plastik, botol plastik, jerigen, toples kaca, gunting, aluminium foil, kapas, tisu, spatula, batang pengaduk, saringan, pH meter (HANA), hand refraktometer (ATC), erlenmeyer, destilator (velp scientifica UDK 149), refraktometer abbe (ATAGO), cawan petri, mikro pipet, pipet tetes, bunsen, *incubator*, vortex, tabung reaksi, labu ukur, gelas beaker, gelas ukur, termometer, statif dan klem, corong, buret, *laminar air flow*, *autoclave*, oven, alat analisis sensori.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain cairan pulpa kakao yang didapat dari perkebunan daerah Pringsewu, provinsi Lampung, kultur scoby yang diperoleh dari Ternatea.house di Bandar Lampung, gula pasir (PSM), aquades, NaOH 0,1 N (Supelco), NaCl 0,85%, alkohol 96% (Medika), media *Plate Count Agar* (PCA) (Merck), dan kombucha komersil yang diproduksi oleh Ternatea.house.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) yang disusun secara faktorial dengan 2 faktor dan 3 kali ulangan. Faktor pertama variasi penambahan gula (G) yang terdiri dari 5 taraf yaitu 5% (G_1), 6,5% (G_2), 8% (G_3), 9,5% (G_4), 11% (G_5). Faktor kedua lama fermentasi (F) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 0 hari (F_0), 7hari (F_7), dan 14 hari (F_{14}). Pada penelitian ini terdapat lima belas kombinasi perlakuan yang akan dicoba yaitu (G_1F_0), (G_2F_0), (G_3F_0), (G_4F_0), (G_5F_0), (G_1F_7), (G_2F_7), (G_3F_7), (G_4F_7), (G_5F_7), (G_1F_{14}), (G_2F_{14}), (G_3F_{14}), (G_4F_{14}), (G_5F_{14}). Tata letak perlakuan pengenceran dan lama fermentasi disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Tata letak kombinasi perlakuan penambahan gula dan lama fermentasi

Ulangan		
I	II	III
G_3F_7	G_4F_{14}	G_1F_0
G_1F_{14}	G_5F_0	G_5F_7
G_5F_0	G_2F_7	G_1F_{14}
G_2F_{14}	G_2F_0	G_2F_7
G_1F_0	G_1F_{14}	G_3F_{14}
G_4F_{14}	G_3F_7	G_5F_0
G_4F_7	G_3F_{14}	G_1F_7
G_5F_7	G_4F_0	G_2F_{14}
G_3F_{14}	G_5F_7	G_2F_0
G_4F_0	G_2F_{14}	G_4F_7
G_1F_7	G_1F_7	G_5F_{14}
G_2F_0	G_3F_0	G_4F_0
G_5F_{14}	G_5F_{14}	G_3F_7
G_2F_7	G_1F_0	G_4F_{14}
G_3F_0	G_4F_7	G_3F_0

Keterangan:

G_1F_0 = Gula 5% fermentasi 0 hari
 G_2F_0 = Gula 6,5% fermentasi 0 hari
 G_3F_0 = Gula 8% fermentasi 0 hari
 G_4F_0 = Gula 9,5% fermentasi 0 hari
 G_5F_0 = Gula 11% fermentasi 0 hari
 G_1F_7 = Gula 5% fermentasi 7 hari
 G_2F_7 = Gula 6,5% fermentasi 7 hari
 G_3F_7 = Gula 8% fermentasi 7 hari

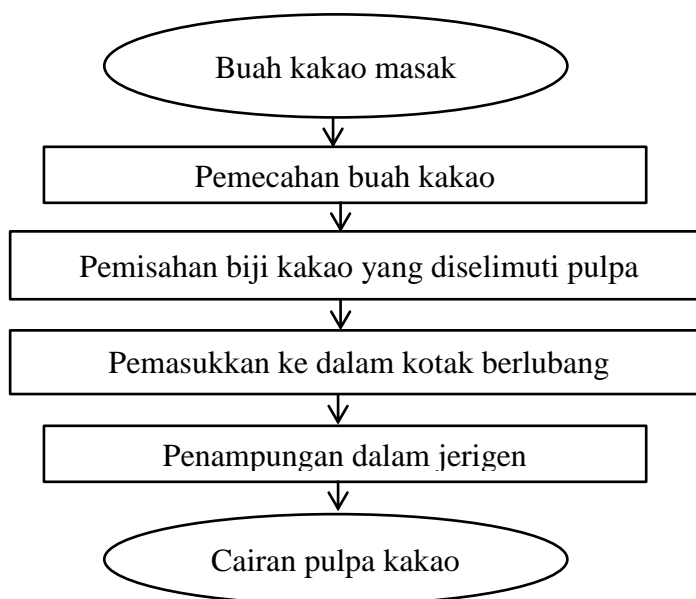
G_4F_7 = Gula 9,5% fermentasi 7 hari
 G_5F_7 = Gula 11% fermentasi 7 hari
 G_1F_{14} = Gula 5% fermentasi 14 hari
 G_2F_{14} = Gula 6,5% fermentasi 14 hari
 G_3F_{14} = Gula 8% fermentasi 14 hari
 G_4F_{14} = Gula 9,5% fermentasi 14 hari
 G_5F_{14} = Gula 11% fermentasi 14 hari

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi uji total padatan terlarut, total asam, kadar alkohol, total mikroba, dan uji sensori. Data dianalisis kehomogenannya dengan uji *Barlett* dan kemenambahan data diuji dengan uji *Tuckey*. Data kemudian dianalisis sidik ragamnya atau *analysis of variance* (ANOVA) untuk mendapatkan pendugaan ragam galat dan uji signifikansi dalam mengetahui perbedaan antar perlakuan. Data selanjutnya akan dilakukan uji lanjut Polynomial Orthogonal pada taraf 5% dan 1% untuk mengetahui pengaruh serta kecenderungan hubungan dari faktor perlakuan dan interaksinya.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Penyiapan Pulpa Kakao Sebagai Bahan Baku Media

Bahan baku yang digunakan adalah cairan pulpa kakao yang berasal dari petani kakao di daerah Pringsewu, Provinsi Lampung. Sejumlah buah kakao dipecah dan diambil biji buahnya, kemudian dimasukkan kedalam kotak berlubang dan dihasilkan cairan pulpa kakao. Cairan pulpa kakao yang keluar ditampung dalam jerigen. Diagram alir pengolahan pulpa kakao terfermentasi dapat dilihat pada Gambar 4.



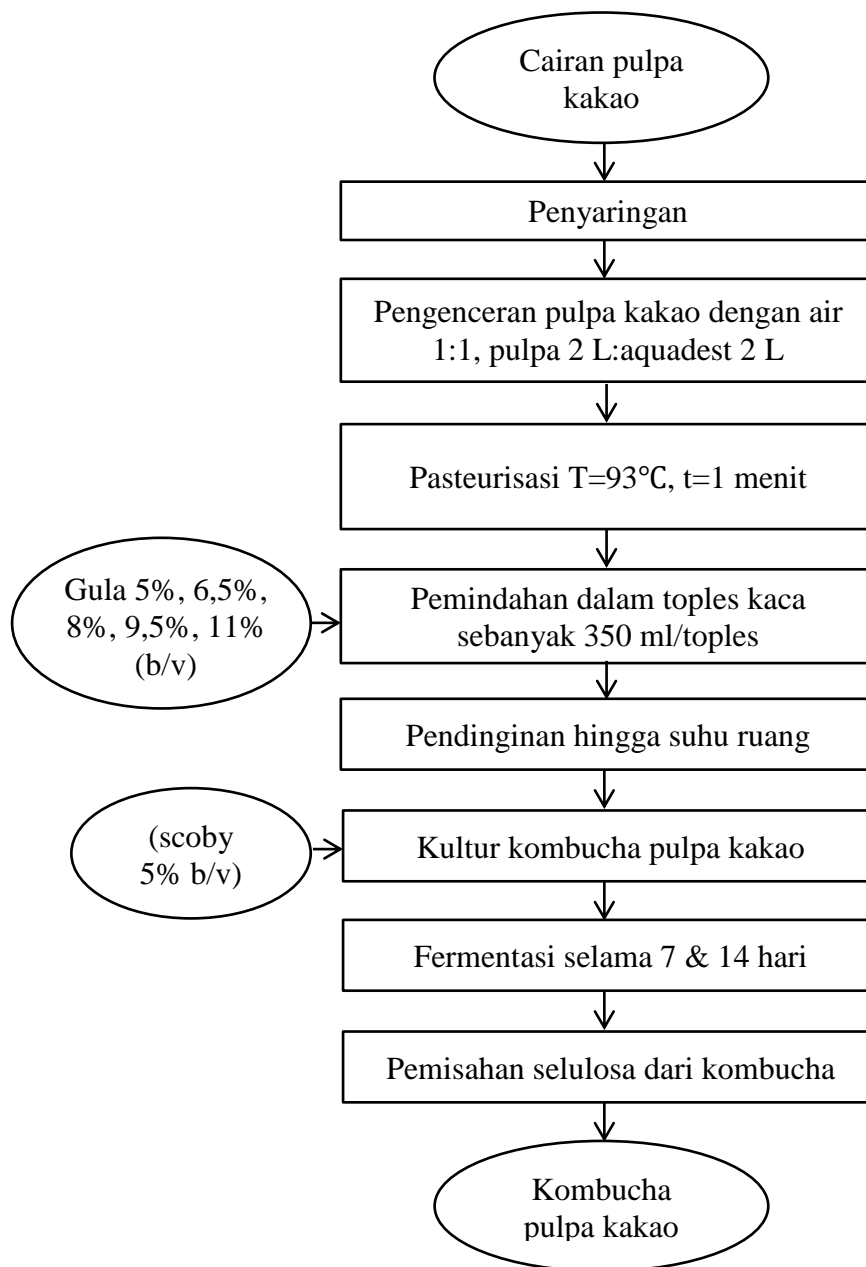
Gambar 4. Diagram alir penyiapan pulpa kakao sebagai bahan baku media
Sumber: Yuliana dkk. (2022)

3.4.2. Persiapan

Tahap persiapan yang dilakukan meliputi penyediaan semua alat dan bahan serta sterilisasi alat. Bahan yang disterilisasi dalam pembuatan kombucha adalah gula pasir, yang dimasukkan dalam erlenmeyer dan di sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang disterilisasi dalam pembuatan kombucha adalah toples kaca, yang disterilkan dengan cara merendamnya dalam air mendidih selama 10 menit. Langkah ini bertujuan untuk memastikan alat tetap steril sehingga proses fermentasi dapat berlangsung dengan optimal.

3.4.3. Pembuatan Kombucha Pulpa Kakao

Proses pembuatan kombucha pulpa kakao menggunakan metode menurut Yuliana dkk. (2019) yang telah dimodifikasi rasio pengencerannya. Pertama, cairan pulpa kakao yang memiliki pH 3,7 dan total padatan terlarut 6°*Brix* disaring. Kedua, diencerkan pulpa:air dengan perbandingan 1:1, masing-masing sebanyak 2 L, setelah diencerkan pH pulpa menjadi 3,9 dan total padatan terlarut menjadi 3°*Brix*. Selanjutnya, larutan pulpa kakao dipasteurisasi pada suhu 93°C selama 1 menit. Larutan pulpa yang sudah dipasteurisasi dipindahkan ke dalam erlenmeyer yang berisi gula pasir yang telah disteril sebelumnya sebanyak 5%, 6,5%, 8%, 9,5%, dan 11% (b/v) dari larutan, lalu didinginkan hingga suhu ruang. Kemudian larutan pulpa kakao dipindahkan ke dalam toples kaca yang telah steril, masing-masing berisi larutan pulpa sebanyak 350 ml dan ditambahkan dengan kultur scoby sebanyak 5% (b/v). Setelah itu, toples ditutup dengan tisu dapur dan diikat karet. Larutan pulpa kakao difermentasi selama 7 dan 14 hari pada suhu kamar. Setelah itu, selulosa dipisahkan dari kombucha dan dihasilkan kombucha pulpa kakao. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao
Sumber: Yuliana dkk. (2019), telah dimodifikasi

3.5. Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini meliputi pengujian total padatan terlarut, total asam, kadar alkohol, total mikroba, dan uji sensori. Adapun tahapan masing- masing pengujian sebagai berikut:

3.5.1. Total Padatan Terlarut (Yuliana *et al.*, 2023)

Analisis total padatan terlarut (TSS) kombucha pulpa kakao ditentukan dengan menggunakan refraktometer analog genggam dan hasilnya dinyatakan sebagai brix. Perubahan kejernihan media kultur diamati selama fermentasi 7 dan 14 hari.

3.5.2. Total Asam (Yuliana *et al.*, 2023)

Pengujian total asam kombucha pulpa kakao dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan pH meter dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan pH 7.01 dan pH 4.01. Sebanyak 20 mL sampel dimasukkan ke dalam gelas beaker, lalu dimasukkan pH meter. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sambil diukur pHnya. Jika pH pada pH meter sudah menunjukkan 8,3 maka proses titrasi dapat dihentikan. Lalu catat jumlah NaOH yang digunakan. Perhitungan total asam tertitrasi sebagai berikut.

$$\text{Total asam titrasi (\%)} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{Eq wt} \times 100}{\text{Volume sampel} \times 1000}$$

Keterangan:

mL NaOH : Jumlah NaOH yang keluar dari buret
 N NaOH : Normalitas larutan NaOH
 Eq wt : *Equivalent weight of acetic acid* (60.05 mg/mEq)
 Volume sampel : Jumlah sampel yang dititrasi

3.5.3. Kadar Alkohol (Christopoulou *et al.*, 2003)

Kadar alkohol minuman kombucha pulpa kakao diukur dengan refraktometer Abbe, setelah melewati tahap destilasi menggunakan alat destilasi velp scientifica UDK 149. Sampel diambil sebanyak 50 ml dan dimasukkan ke dalam tabung velp pada alat destilasi, kemudian pilih metode yang sesuai dengan sampel dan diatur volume sampel yang akan digunakan dan pilih tombol start. Hasil destilat ditampung pada wadah dan siap diukur indeks biasanya menggunakan reafraktometer Abbe. Selanjutnya kadar alkohol dihitung dengan rumus yang

disesuaikan dengan kurva standar alkohol yang telah dibuat. Perhitungan kadar alkohol dihitung dengan rumus persamaan kurva standar alkohol :

$$y = ax + b$$

Keterangan:

- y : Absorbansi
- a : Kelandaian (slope) kurva garis lurus
- x : Konsentrasi alkohol
- b : Perpotongan (intercept) kurva dengan ordinat atau sumbu tegak

3.5.5. Total Mikroba (Yuliana *et al.*, 2023)

Analisis total mikroba menggunakan metode perhitungan TPC (*Total Plate Count*). Sampel kombucha pulpa kakao diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet, kemudian dilarutkan dengan 9 mL larutan pengencer steril (NaCl 0,85%). Selanjutnya sampel dilakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-7} dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} diambil sebanyak 1 mL, hasil pengenceran dipipetkan ke dalam cawan petri steril (duplo) yang telah berisi media PCA. Kemudian cawan di inkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 28°C selama 24-48 jam. Perhitungan TPC berdasarkan interval 30-300 koloni dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{TPC (koloni/g)} = \text{Jumlah koloni percawan} \times (1/\text{faktor pengenceran})$$

3.5.6. Uji Sensori

Pengujian sensori dilakukan dengan uji skoring dan uji hedonik. Uji skoring merupakan uji dimana panelis diminta untuk memberikan penilaian yang lebih spesifik pada atribut mutu produk dengan pendekatan skala berupa skor atau angka (Sutrisno dkk., 2019). Sementara itu, uji hedonik bertujuan untuk mengetahui kesan kesukaan pada suatu produk dengan mengukur tingkat kesukaan panelis terhadap sampel yang diberikan. Tingkat kesukaan ini disebut skala hedonik, yaitu amat sangat suka, sangat suka, suka, agak suka, netral, agak

tidak suka, tidak suka, sangat tidak suka, dan amat sangat tidak suka (Qamariah dkk., 2022). Selanjutnya, penentuan panelis dilakukan menurut Haryati dkk (2015), dimana jumlah panelis minimal yang dibutuhkan dalam uji penerimaan bila panelisnya bukan panelis terlatih adalah 30 orang dan panelis tersebut adalah orang yang sama untuk tiap kali pengujian.

Dengan demikian, penilaian sensori minuman kombucha pulpa kakao dilakukan dengan 30 panelis yang memberikan skor sesuai dengan penerimaan dan kesan masing-masing. Panelis yang memberikan penilaian merupakan mahasiswa jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung. Kuisisioner uji skoring pada kombucha pulpa kakao disajikan pada Tabel 7 dan uji hedonik disajikan pada Tabel 8. Setelah didapatkan data hasil uji skoring dan hedonik, dilakukan analisis menggunakan polynomial orthogonal yang bertujuan untuk mengetahui hubungan antara respon panelis dan taraf perlakuan yang dilakukan.

Tabel 7. Kuesioner uji skoring minuman kombucha pulpa kakao kloter pertama dan kedua

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

KUESIONER UJI SKORING

A. Uji Skoring

Petunjuk pengisian:
 Dihadapan saudara/i disajikan (5) sampel minuman kombucha berbahan dasar pulpa kakao yang telah diberi kode acak. Saudara/i diminta untuk memberikan skor penilaian terhadap **rasa, aroma, warna, dan *aftertaste*** dengan cara memberi tanda (✓) pada masing-masing kode sampel yang sudah disediakan.

RASA MANIS

● ——— ● ——— ● ——— ● ——— ●

1 2 3 4 5

Tidak manis Sedikit Sedang Manis Sangat manis

290	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
122	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
865	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
317	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
525	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

RASA ASAM

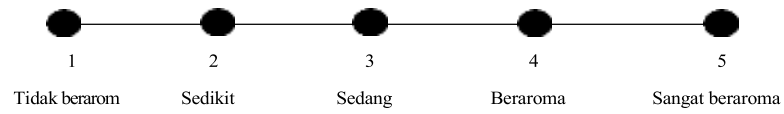
● ——— ● ——— ● ——— ● ——— ●

1 2 3 4 5

Tidak asam Sedikit Sedang Asam Sangat asam

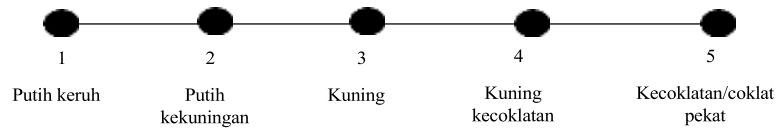
290	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
122	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
865	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
317	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
525	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

AROMA



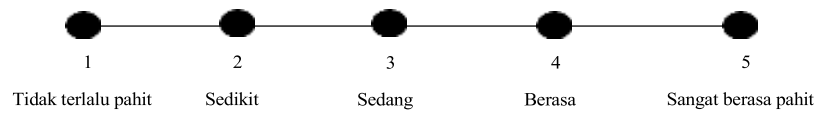
290	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
122	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
865	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
317	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
525	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

WARNA



290	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
122	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
865	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
317	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
525	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

AFTERTASTE



290	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
122	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
865	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
317	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
525	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Semakin tinggi penambahan gula (G1 G2 G3 G4 G5), nilai TPT, total asam, total mikroba, kadar alkohol, skor rasa manis, skor aroma asam, skor warna, kesukaan terhadap rasa, aroma, dan penerimaan keseluruhan semakin meningkat. Namun, skor rasa asam dan *aftertaste* mengalami penurunan.
2. Semakin lama fermentasi (F0 F7 F14) dilakukan, nilai TPT, skor rasa manis, skor warna, skor *aftertaste*, kesukaan terhadap rasa, dan penerimaan keseluruhan semakin menurun. Namun, nilai total asam, skor rasa asam, skor aroma asam, dan skor aroma mengalami peningkatan. Selanjutnya, nilai total mikroba pada F0 ke F7 mengalami peningkatan, dan pada F7 ke F14 mengalami penurunan.
3. Kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi menghasilkan karakteristik minuman kombucha pulpa kakao terbaik pada perlakuan G5F7 (konsentrasi gula 11% fermentasi 7 hari) dengan nilai TPT 12,03°*Brix*; total asam 0,48%; kadar alkohol 0,1668%; total mikroba 8,69 log CFU/ml; rasa manis 3,72 (manis); warna 3,88 (kuning kecoklatan); rasa 5,28 (agak suka); aroma 4,42 (netral); warna 4,90 (agak suka); dan penerimaan keseluruhan 5,27 (agak suka).

5.2. Saran

Saran yang diajukan dari penelitian ini adalah:

1. Pengujian menggunakan jenis gula lainnya (misalnya gula kelapa, gula aren, atau madu) atau variasi jumlah starter mikroba yang digunakan.

2. Pengujian tiap parameter dilakukan setiap hari sehingga perkembangan perubahan yang terjadi pada minuman kombucha pulpa kakao terpantau secara rinci.

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.
- Abubakar, Y., Muzaifa, M., Widayat, P, Martunis., dan Safitri, R. 2022. Peningkatan mutu kakao melalui fermentasi menggunakan starter kering bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat *indigenous* kakao aceh. *Agrointek*. 16(1): 84-95.
- Adrista, G. G., Wartini, N. M., dan Arnata, W. 2016. Pengaruh penambahan etanol dan lama fermentasi lanjutan cairan pulpa hasil samping fermentasi biji kakao terhadap karakteristik cuka kakao. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 4(4): 1-11.
- Anvoh, K. Y. B., Zoro, B. A., Gnakri, D. 2009. Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8(2):129-133.
- Association of Official Analytical Chemist. 2000. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Sixteenth Edition, 5th Revision, 1999. Vol 2. USA. AOAC Inc. 1904 hlm.
- 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.
- 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.
- Budiandari, R. U., Azara, R., Adawiyah, R., dan Prihatiningrum, A. E. 2023. Studi karakteristik kimia minuman probiotik kombucha sari kulit buah nanas (*ananas comosus*). *Teknologi Pangan: Media Informasi dan Komunikasi Ilmiah Teknologi Pertanian*. 14(2): 181-188.
- Chandrasekaran, M. 2012. *Valorization Of Food Processing By-Products*. Broken Sound Parkway NW: CRC press, Taylor and Francis Group. 836 hlm.

- 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.
- Cholidah, A. I., Danu, D., Nurrosyidah, I. H. 2020. Pengaruh lama waktu fermentasi kombucha rosela (*hibiscus sabdarifda l.*) terhadap aktivitas antibakteri *escherichia coli*. *Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia*. 2(3): 186-210.
- Christopoulou, M. G., Kyriakidis, N.V., and Athanasopoulos, P. E. 2003. New refractive index method for measurement of alcoholic strength of small volume samples. *Journal of AOAC International*. 86(6): 1232-1235.
- Chu, S. C., and Chen, C. 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. *Food Chemistry*. 98: 502-507.
- Cohen, G., Sela, D. A., and Nolden, A. A. 2023. Sucrose concentration and fermentation temperature impact the sensory characteristics and liking of kombucha. *Foods*. 12(16): 1-13.
- 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. 400 hlm.
- Dewan Standarisasi Nasional. 2009. SNI 7552:2009 *Minuman Susu Fermentasi Berperisa*. Standar Nasional Indonesia. Jakarta. 45 hlm.
- Dewayani, W., dan Syamsuri, R. 2019. Pengaruh faktor pengenceran pulp dan lama penyimpanan terhadap kualitas nata de kakao. *Buletin Inovasi Pertanian*. 16: 75-81.
- Direktoral Jenderal Perkebunan. 2022. *Statistik Perkebunan Unggulan Nasional 2020-2022: Kakao*. 1053 hlm.
- Direktoral Jenderal Perkebunan. 2023. *Statistik Perkebunan Unggulan Nasional 2021-2023: Kakao*. 1061 hlm.
- Draft Uganda Standard. 2022. *Kombucha Specification*. Second Edition. DUS 2037. 13 hlm.
- Effendi, S. 2012. *Teknologi Pengolahan dan Pengawetan Pangan*. Alfabeta. Bandung. 202 hlm.
- Farhanandi, B. W., dan Indah, N. K. 2022. Karakteristik morfologi dan anatomi tanaman kakao (*theobroma cacao l.*) yang tumbuh pada ketinggian berbeda. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi*. 11(2): 310-325.

- Fauzi, M. B., dan Firmanto, H. 2021. Kombucha ekstrak pulpa buah kakao sebagai minuman fungsional. *Warta: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. 33(1): 27-30.
- Fadillah, M. F. 2022. Karakteristik biokimia dan mikrobiologi pada larutan fermentasi kombucha bunga telang (*clitoria ternatea l*) sebagai inovasi produk bioteknologi terkini. *BIOGENERASI: Jurnal Pendidikan Biologi*. 7(2): 19-34.
- 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. 480 hlm.
- 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.
- Firdaus, S., Indah, C, A., Isnaini, L., dan Aminah, S. 2020. “Review” teh kombucha sebagai minuman fungsional dengan berbagai bahan dasar teh. *Prosiding Seminar Nasional Unimus*. 3: 715-730.
- Fitri, E., Harun, N., dan Johan, V. S. 2017. Konsentrasi gula dan sari buah terhadap kualitas sirup belimbing wuluh (*averrhoa bilimbi L.*). *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Pertanian Universitas Riau*. 4(1): 1-13.
- Gumanti, Z., Salsabila, A. P., Sihombing, M. E., Peristiwa., dan Kusnadi. 2023. Pengaruh lama fermentasi terhadap mutu organoleptik pada proses pembuatan kombucha sari kulit buah naga merah (*hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Pengolahan Pangan*. 8(1): 25-32.
- 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.
- 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).
- Haryati, E., T., Heppy, F., dan Ahmadi, K. 2015. Pendugaan umur simpan menggunakan metode accelerated shelf-life testing (ASLT) dengan pendekatan arrhenius pada produk tape ketan hitam khas Mojokerto hasil sterilisasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(1): 156–165.
- 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.

- 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.
- Indriani, Y, H. 2004. *Membuat Kompos Secara Kilat*. Penebar Swadaya. Jakarta. 62 hlm.
- 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.
- Jayabalan, R., Marimuthu S., and Swaminathan, K. 2007. Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*. 102(1): 392– 394.
- Jayabalan, R., Malbasa, R., Loncar, E., Vitas, J., Sathishkumar, M. 2014. Review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13(4):538-550.
- Jeanroy A. and Wasserman, M. 2019. *Fermenting for Dummies*. John Wiley & Sons INC International Concepts. 336 hlm.
- Kementan. 2019. *Hulu Hilir Kakao*. Pusat Perpustakaan dan Penyebaran Teknologi Pertanian. Bogor. 89 hlm.
- Khoidir, S. I. 2023. Karakteristik fisik, kimia, dan sensoris biji kakao criollo, forastero, dan trinitario. *Journal Of Comprehensive Science*. 2(3): 764-770.
- Kresnowati, P., Suryani, L., and Affifah, M. 2013. Improvement of cocoa beans fermentation by LAB starter addition. *Journal of Medical and Bioengineering*. 2(4): 274-278.
- Kurniawan, M. B., Ginting, S., dan Nurminah, M. 2017. Pengaruh penambahan gula dan starter terhadap karakteristik minuman teh kombucha daun gambir (*uncaria gambir roxb*). *Jurnal Rekayasa Pangan dan Pertanian*. 5(2): 251-257.
- 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.
- Lapuz, M. M., Gallardo, E. G., and Palo, M. A. 1969. The nata organs cultural requirements characteristics and identity. *The Philipines Journal and Science*. 96: 91-96.

- Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, R., Oros, J. H., and Aburto, A. E. 2018. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites, *cyta* . *Journal of Food*. 16(1): 390-399.
- Lehninger, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta. 386 hlm.
- Lukito. 2010. *Budidaya Kakao*. Pusat penelitian kopi dan kakao Indonesia. Jakarta. hlm 298.
- Magwaza, L. S., and Opara, U, L. 2015. Analytical methods for determination of sugars and sweetness of horticultural products-a review. *Scientia Horticulturae*. 184: 179-192.
- 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.
- Miranda, M. P., Putra, G., dan Suhendra, L. 2019. Karakteristik ekstrak kulit buah kakao (*theobroma cacao l*) sebagai sumber antioksidan pada perlakuan konsentrasi pelarut dan ukuran partikel. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 8(1): 28-38.
- Majelis Ulama Indonesia. 2018. *Fatwa MUI No 10 Tahun 2018 Tentang Produk Makanan dan Minuman Yang Mengandung Alkohol/Etanol*. Komisi Fatwa Majelis Indonesia. Jakarta.
- Murugan, K., dan Al-Sohaibani, S. 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. hlm 455-488.
- Naland, H. 2004. *Kombucha Teh Ajaib Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit*. PT Agro Media Pustaka. Jakarta. 64 hlm.
- Napitupulu, M. O. W., Setyahadi., Lubis, L. M. 2016. Pengaruh variasi konsentrasi gula sukrosa dan lama fermentasi terhadap pembuatan kopi kombucha. *Jurnal Rekayasa Pangan dan Pertanian*. 3: 316-322.
- Natalingsih. 2019. Pengaruh ph awal dan presentase amonium sulfat terhadap produk nata de kakao yang dihasilkan. *Jurnal Universitas Bandung Raya*.
- Naufal, A., Harini, N., dan Putri, D. N. 2022. Karakteristik kimia dan sensori minuman instan kombucha dari kulit buah naga merah (*hylocereus polyrhizus*) berdasarkan konsentrasi gula dan lama fermentasi. *Food Technology and Halal Science Journal*. 5(2): 137:153.
- 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*.
- Nurfaillah., Masri., Sari, E. R., Herlinda., dan Patang. 2018. Pemanfaatan limbah pulp kakao menjadi nata de cacao. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. 4: 24-33.
- Nyhan, L.M., Lynch, K.M., Sahin, A.W., Arendt, E.K. 2022. Advances in kombucha tea fermentation: a review. *Appl. Microbiol.* 2:73-103.
- Palijama, S., Talahatu, J., dan Picauly, P. 2016. Pengaruh tingkat konsentrasi gula pada proses pengolahan manisan salak terhadap vitamin c dan tingkat kesukaan konsumen. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 5(2): 37-41.
- Palmer, J. 2013. *Water: A comprehensive guide for brewers*. Boulder, CO: Brewers Publication. 300 hlm.
- Pawaskar, S. P., Pawar, C. D., Dhumal, R. D., Bhuvad, A. V., and Kadam, J. J. 2020. Effect of different dilution and ph levels on chemical composition and fermentation of kokum must. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 11: 343-351.
- Permadi, M. R., Oktafa, H., dan Agustianto, K. 2019. Pernacangan pengujian *preference test*, uji hedonik dan mutu hedonik menggunakan algoritma radial basis function network. *Sintech Journal*. 2(2): 98-107.
- Pothakos, V., Illegghems, K., Laureys, D. and Vuyst, L. D. 2016. *Acetic acid bacteria in fermented food and beverage ecosystems*. *Acetic Acid Bacteria*. Springer. 99 hlm.
- Pratiwi, S. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta. 237 hlm.
- Puspaningrum, D. H. D., Sumandewi, N, L, U., dan Sari, N. K. Y. 2022. Karakteristik kimia dan aktivitas antioksidan selama fermentasi kombucha cascara kopi arabika (*coffe arabika l.*) desa catur kabupaten bangli. *Jurnal Sains dan Edukasi Sains*. 5(2): 44-51.
- Qamariah, N., Handayani, R., dan Mahendra A. I. 2022. Uji hedonik dan daya simpan sediaan salep ekstrak etanol umbi hati tanah. *Jurnal Surya Medika (JSM)*. 7(2): 124-131.
- Rahayu, E, S. 2020. Pengaruh variasi waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan pada minuman kombucha pulpa kakao (*theobroma cacao l*). [Skripsi]. Universitas Tadulako. Palu.
- Rahmawasih. 2016. Efektivitas limbah pulp kakao (*theobroma cacao l.*) Sebagai herbisida gulma rumput teki. *Jurnal Pertanian Berkelanjutan*. 4(1): 1-10.

- Reiss, J. 1994. Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. *Zeitschrift Fuer Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*. 198(3): 258-261.
- Rindiani, S. D., Suryani, T. 2023. Aktivitas antioksidan dan kualitas organoleptik kombucha daun ciplukan pada variasi jenis gula dan lama fermentasi. *Bioedusains: Jurnal Pendidikan Biologi dan Sains*. 6(2): 516-530.
- Rinihapsari, E., dan Catur. 2008. Fermentasi kombucha dan potensinya sebagai minuman kesehatan. *Media Farmasi Indonesia*. 3(2): 241-246.
- Riono, Y. 2020. Pertumbuhan bibit kakao (*teobroma cacao l*) dengan berbagai pemberian dosis serbuk gergaji pada varietas (bundo-f1) di tanah gambut. *Jurnal Selodang Mayang*. 6(3): 163-171.
- Rohaya, S., Ibrahim, T., dan Hasni, D. 2023. Penerimaan konsumen terhadap minuman fungsional *fizzy kombucha cascara* berdasarakan metode penambahan jahe (*zingiber officinale*) dan lama fermentasi. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan Pengabdian*. 3: 76-80.
- Safitri, D. 2019. Pengaruh lama fermentasi limbah cair pulp kakao (*theobroma cacao l.*) sebagai bioherbisida gulma belulang (*eleusine indicl.*). [Skripsi]. UIN Raden Intan. Lampung.
- Sabahannur, S. T., dan Ralle, A. 2018. Peningkatan kadar alkohol, asam dan polifenol limbah cairan pulp biji kakao dengan penambahan sukrosa dan ragi. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*. 13(1): 53-61.
- Sankaranarayanan, A., Amaresan, N. and Dhanasekaran, D. 2020. *Fermented Food Product*. CRC Press. London New York. 430 hlm.
- 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.
- Sinamo, K. N., Ginting, S., and Pratama, S. effect of sugar concentration and fermentation time on secang kombucha drink. 2022. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 977(1): 1-7.
- Sugiharti, E. 2016. *Budidaya Kakao*. Nuansa Cendekia. Bandung. 68 hlm.
- Suhardini, P. N. dan Zubaidah, E. 2016. Studi aktivitas antioksidan kombucha dari berbagai jenis daun selama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Argoindustri*. 4(1): 221-229.
- Suhrman, S. 2012. Teh kombucha sebagai minuman fungsional untuk meningkatkan daya tahan tubuh. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. 18(2): 26-30.

- Sulistiawaty, L., dan Solihat, I. 2022. Kombucha: fisikokimia dan studi kritis tingkat kehalalan. *Warta Akab*. 46(1): 21-27.
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Jiang, X. M., and Zhao, Y. P. 2014. Selected nonSaccharomyces 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.
- Sutrisno, O. D., Agustina, L., dan Hakim, H. M. A. 2019. Pengaruh jenis dan konsentrasi penstabil pada pembuatan minuman probiotik kacang negara (*vigna unguiculata ssp. Cylindrica*). *Pro Food (Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 5(2): 496-506.
- Taslim, M., Mailoa, M., dan Rijal, M. 2017. Pengaruh pH dan lama fermentasi terhadap produksi ethanol dari *sargassum crassifolium*. *Jurnal Biologi Science & Education*. 6(1): 13-25.
- 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.
- US EAS 104. 2014. Alcoholic Beverages_Methods of Sampling and Test. UNBS/TC2/SC 16.
- US EAS East African Standard. 2001. Hygiene in the food and drink manufacturing industry - Code of practice. ICS 67.020.
- US ISO 6634. 1982. Fruits, vegetables and derived products - Determination of arsenic content - Silver diethyldithiocarbamate spectrophotometric method.
- US ISO 6637. 1984. Fruits, vegetables and derived products — Determination of mercury content - Flameless atomic absorption method.
- US ISO 6561-2. 2005. Fruits, vegetables and derived products - Determination of cadmium content - Part 2: Method using flame atomic absorption spectrometry.
- USDA Standard. 1967. Agriculture Handbook 341 for Food and Farms Products. Department of Agriculture. Consumer and Marketing Service Information Division. Washington DC.
- US ISO 7251. 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli - Most probable number technique.

- US ISO 6888-1. 2021. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species).
- US ISO 6579-1. 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- 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.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., Renard, T., Rollan, S., & Taillandier, P. 2019. Impact of fermentation conditions on the production of bioactive compounds with anticancer, anti-inflammatory and antioxidant properties in kombucha tea extracts. *Process Biochemistry*. 83: 44-54.
- 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.
- Vohra, B.M., Fazry, S., Sairi, F., Babul-airianah, O. 2019. Effects of medium variation and fermentation time on the antioxidant and antimicrobial properties of kombucha. *Malays. J. Fundam. Appl. Sci*. 15: 298-302.
- Waluyo, L. 2005. *Mikrobiologi Umum*. UMM Press. Malang. 372 hlm.
- Watawana, M. I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C. B., Waisundara, V.Y. 2015. Review article health, wellness, and safety aspects of the consumption of kombucha. *Journal of Chemistry*.
- 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. 541 hlm.
- Wibowo, K, C. 2023. Kajian derajat brix dan waktu fermentasi pulpa kakao (*theobroma cacao linn*) terhadap total fenol, aktivitas antioksidan dan sifat sensori pada pembuatan kombucha. [Skripsi]. Universitas Lampung. Lampung.
- Widyotomo, S. 2008. Teknologi fermentasi dan diversifikasi pulpa kakao menjadi produk yang bermutu dan bernilai tambah. *Warta Review Penelitian Kopi dan Kakao*. 24: 65-82.

- Wistiana, D., dan Zubaidah, E. 2015. Karakteristik kimiawi dan mikrobiologis kombucha dari berbagai daun tinggi fenol selama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(4): 31-34.
- Yuliana, N., Nurainy, F., Sari, G. W., Sumardi., and Widiastuti, E. L. 2023. Total microbe, physicochemical property, and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. *Aplied Food Research*. 3: 1-6.
- Yuliana, N., Widiastuti, E, L., dan Setiawan, T. 2019. Paten_Kombucha Pulpa Coklat 001 Plus. Pdf 2019. 70 hlm.
- Yuliana, N., Nurainy, F., dan Sumardi. 2022. *Pengolahan Hasil Samping Buah Kakao*. Pusaka Media. Bandar Lampung. hlm 70.
- Yuliana, N., Sari, G. W., Widiastuti, E. L., Suharyono., and Setiawan, T. 2022. The sensory of kombucha cacao pulp (theobroma cacao) fermented using symbiotic culture of bacteria and yeast (scoby) as a starter. *The 1st International Conference on Agricultural, Nutraceutical, and Food Science (ICANFS) 2022*. 1: 16-21.
- Yunianta. 2010. Limbah cair industri kakao sebagai bahan pembuat nata. *Jurnal Teknik Industri*. 11(1): 31-34.
- Zailani, N. S. and Adnan, A. 2022. Substrates and metabolic pathways in symbiotic culture of bacteria and yeast (scoby) fermentation: a mini review. *Journal Teknologi (Sciences and Engineering)*. 84(5): 155–165.
- Zaitoun, M., Ghanem, M., and Harphoush, S. 2018. Sugars: types and their functional properties in food and human health. *International Journal of Public Health Research*. 6(4): 93-99.
- 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.
- 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.
- Zubaidah, E., Effendi, F. D., dan Afgani, C. A. *Kombucha: Mikrobiologi, Teknologi, dan Manfaat Kesehatan*. Universitas Brawijaya Press. Malang. hlm 160.