

**KAJIAN DERAJAT BRIX PULPA KAKAO DAN LAMA FERMENTASI
TERHADAP KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA, MIKROBIAL DAN
SENSORI MINUMAN KOMBUCHA**

(Tesis)

Oleh

**IMAM MAHFUDDIN
NPM 2124051009**



**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRACT

STUDY OF THE BRIX DEGREE OF COCOA PULP AND FERMENTATION DURATION ON THE PHYSICOCHEMICAL, MICROBIAL, AND SENSORY CHARACTERISTICS OF KOMBUCHA BEVERAGE

By

IMAM MAHFUDDIN

Cocoa pulp is a by-product of cocoa processing that contains high sugar levels and has the potential to be used as a fermentation medium for kombucha production. This study aims to determine the effect of sugar concentration and fermentation time on the characteristics of kombucha made from cocoa pulp. The research design employed Response Surface Methodology (RSM) with variations in sugar concentration (11, 12, 14, 16, and 17 °Brix) and fermentation time (2, 4, 8, 12, and 14 days). The parameters measured included total acid, alcohol content, total microbes, and total dissolved solids. The results showed that fermentation time significantly affected the microbial count ($p < 0.05$), while the interaction between °Brix level and fermentation time significantly influenced alcohol content. The optimal combination was found at 12 °Brix with a fermentation time of 12 days, resulting in kombucha with an alcohol content of 0.55%, total acid of 1.27%, and total microbes of $8.37 \log (x+1)$ CFU/mL. Cocoa pulp kombucha has the potential to be developed as a high-value functional health beverage product.

Keywords: fermentation, kombucha, cocoa pulp, sugar concentration, fermentation time

ABSTRAK

KAJIAN DERAJAT BRIX PULPA KAKAO DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA, MIKROBIAL DAN SENSORI MINUMAN KOMBUCHA

Oleh

IMAM MAHFUDDIN

Pulpa kakao merupakan limbah dari proses pengolahan kakao yang memiliki kandungan gula tinggi dan berpotensi sebagai media fermentasi untuk pembuatan kombucha. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh Derajat Brix dan lama fermentasi terhadap karakteristik kombucha berbahan dasar pulpa kakao. Desain penelitian menggunakan Response Surface Methodology (RSM) dengan variasi Derajat Brix (11, 12, 14, 16, dan 17 °Brix) dan lama fermentasi (2, 4, 8, 12, dan 14 hari). Parameter yang diukur meliputi total asam, kadar alkohol, total mikroba, dan total padatan terlarut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama fermentasi secara signifikan memengaruhi jumlah mikroba ($p < 0,05$), sementara interaksi antara derajat °Brix dan waktu fermentasi signifikan memengaruhi kadar alkohol. Kombinasi optimal ditemukan pada 12 °Brix dengan fermentasi selama 12 hari, menghasilkan kombucha dengan kadar alkohol 0,55%, total asam 1,27%, dan total mikroba 8,37 log (x+1) CFU/mL. Kombucha pulpa kakao berpotensi sebagai produk minuman kesehatan fungsional yang bernilai tambah tinggi.

Kata Kunci: fermentasi, kombucha, pulpa kakao, Derajat Brix, lama fermentasi

**KAJIAN DERAJAT BRIX PULPA KAKAO DAN LAMA FERMENTASI
TERHADAP KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA, MIKROBIAL DAN
SENSORI MINUMAN KOMBUCHA**

Oleh

IMAM MAHFUDDIN

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
MAGISTER TEKNOLOGI PERTANIAN

Pada

Program Pascasarjana Magister Teknologi Industri Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Lampung



**PROGRAM PASCA SARJANA
MAGISTER TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

Judul Tesis

**: KAJIAN DERAJAT BRIX PULPA KAKAO
DAN LAMA FERMENTASI TERHADAP
KARAKTERISTIK FISIKOKIMIA,
MIKROBIAL DAN SENSORI MINUMAN
KOMBUCHA**

Nama Mahasiswa

: Imam Mahfuddin

Nomor Pokok Mahasiswa

: 2124051009

Program Studi

: Magister Teknologi Industri Pertanian

Fakultas

: Pertanian



I. Komisi Pembimbing

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

NIP. 19650725 199203 2 002

Prof. Dr. Sumardi, M.Si

NIP. 19650325 199103 1 003

2. Ketua Program Studi Magister Teknologi Industri Pertanian

Prof. Dr. Eng. Ir. Udin Hasanudin, M.T.

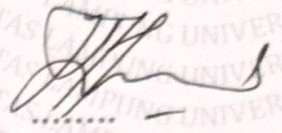
NIP. 19640106 198803 1 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

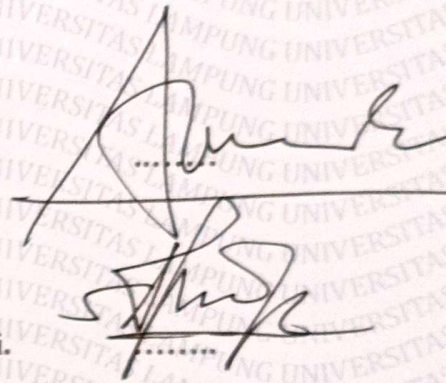
Ketua

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



Sekretaris

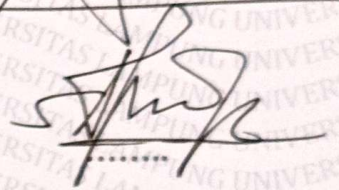
: Prof. Dr. Sumardi, M.Si.



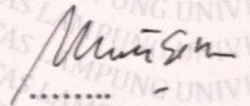
Penguji

Bukan Pembimbing

: Prof. Dr. Ir. Samsul Rizal, M.Si.



Prof. Dr. Dra. Maria Erna K, M.Sc.

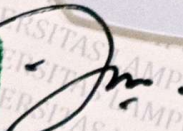


2. Dekan Fakultas Pertanian

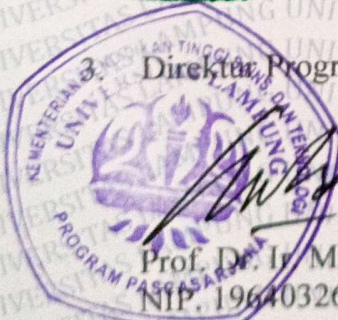


Dr. Kuswanta Futas Hidayat, M.P

NIP. 19641118 198902 1 002

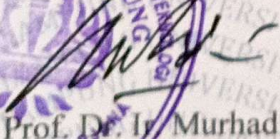


3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si

NIP. 19640326 198902 1 001



Tanggal Lulus Ujian Tesis : 14 Januari 2025

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

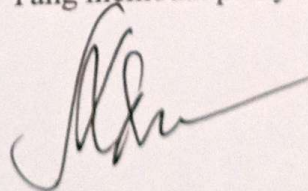
Nama : Imam Mahfuddin

NPM : 2124051009

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) **Prof. Dr. Sumardi, M.Si.** 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, dan lain-lain) 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, 14 Januari 2025
Yang membuat pernyataan



Imam Mahfuddin
NPM 2124051009

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Desa Natar, Kecamatan Natar Kabupaten Lampung Selatan pada tanggal 03 Desember 1992 sebagai anak pertama dari empat bersaudara dari pasangan Bapak Sukarman dan Ibu Marfu'ah. Penulis telah menempuh Pendidikan formal dimulai pada Tahun 1998 di TK Al – Azhar 8, Tahun 1998 – 2004 di SDN 04 Natar,

Tahun 2004 – 2007 melanjutkan pendidikan di SMPN 01 Natar, kemudian Tahun 2007 – 2010 penulis melanjutkan Pendidikan di SMAN 1 Natar. Tahun 2010 penulis diterima di Perguruan Tinggi Negeri sebagai mahasiswa Program Diploma IV (D-IV) Program Studi Produksi dan Manajemen Industri Perkebunan, Jurusan Budidaya Tanaman Perkebunan, Politeknik Negeri Lampung. Penulis menyelesaikan studi pada bulan agustus 2014. Tahun 2021 penulis melanjutkan studi pada Program Pascasarjana (S2) dengan jurusan Magister Teknologi Industri Pertanian di Universitas Lampung.

SANWACANA

Bismillahirrahmanirrahim. Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya tesis ini dapat diselesaikan. Tesis dengan judul “Kajian Derajat Brix Pulpa Kakao Dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Fisikokimia, Mikrobial Dan Sensori Minuman Kombucha” adalah salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Teknologi Pertanian di Universitas Lampung. 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 terimakasih kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P., Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bapak Prof. Dr. Eng. Ir. Udin Hasanudin, M.T., 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 perhatian, bimbingan, saran, nasihat dan arahan kepada penulis dalam proses penyelesaian tesis ini. Terimakasih juga atas ilmu yang diberikan oleh ibu selama perkuliahan, Semoga ilmu yang ibu berikan menjadi pahala dan amal jariyah, aamiin.
4. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si. selaku pembimbing kedua atas kesediaannya memberikan bimbingan, nasihat, saran dan arahan serta dukungannya kepada penulis dalam penyelesaian tesis ini.
5. Bapak Dr. Ir. Subeki, M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan dukungan dan arahan selama proses perkuliahan.
6. Bapak Prof. Dr. Ir. Samsul Rizal, M.Si., selaku Dosen Penguji Utama pada tesis ini, terimakasih atas masukan dan sarannya.

7. Ibu Prof. Dr. Dra. Maria Erna K, M.Sc. atas kesediaannya menjadi Penguji menggantikan bapak Dr. Ir. Suharyono AS, M.Si yang sudah pensiun. Terimakasih atas saran dan masukannya dalam penyelesaian tesis ini.
8. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan (Kemdikbud) dan Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) atas pemberian Beasiswa Pendidikan Indonesia (BPI)-LPDP selama masa perkuliahan hingga lulus.
9. Bapak dan Ibu Dosen yang telah memberikan ilmu dan wawasan kepada penulis selama kuliah.
10. Istriku tercinta Siti Rahmah Kurnia Sari, A.Md., Bapak Sukarman, Mamak Marfu'ah, Emak Yuliah Nur, Adik-adikku Siti Karomah, SE., Nurul Hasanah, A.Md, Isti Mutmainah, S.Ars., Muhammad Awaludin Fajri, Muhammad Agung Darmawan, Sidik Kurniawan dan semua anak-anakku Akhtar Asyrafurrahman Dzaky Maritza, Akhdan Ziyad Alfarizi, Hilya Ajla Adzkia serta seluruh keluarga besar yang telah memberikan doa, dukungan moral dan material.
11. Keluarga MTIP Angkatan 2021 serta teman-teman seperjuangan saat penelitian. Terimakasih atas segala bantuan, semangat, dukungan, dan kebersamaannya selama ini.
12. 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, 14 Januari 2025
Penulis

Imam Mahfuddin

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xv
I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Kerangka Pemikiran	3
1.4 Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Kakao.....	6
2.2 Pulpa Kakao.....	7
2.2.1 Proses Pengambilan Pulpa Kakao	8
2.2.2 Karakteristik dan Kandungan Nutrisi Pulpa Kakao	9
2.3 Kombucha.....	10
2.3.1 Karakteristik	120
2.3.2 Mikroba yang Berperan dalam Kombucha.....	12
2.3.3 Proses Pembuatan Kombucha dari Pulpa Kakao.....	13
2.4 Minuman Probiotik.....	14
III. METODE PENELITIAN	16
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	16
3.2 Bahan dan Alat	16
3.3 Metode Penelitian	16
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	18
3.4.1 Penyiapan media pulpa kakao.....	18

3.4.2 Proses Fermentasi	19
3.5 Pengamatan.....	21
3.5.1 Total Asam	21
3.5.2 Total Padatan Terlarut	21
3.5.3 Total BAL, BAA, dan Khamir	22
3.5.4 Uji Kadar Alkohol	23
3.5.5 Uji Sensori	23
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	Error!
Bookmark not defined.	
4.1 Total BAL,BAA,khamir	28
4.2 Kadar Alkohol	34
4.3 Total Padatan Terlarut	38
4.4 Total Asam	42
4.5 Uji Sensori	45
4.6 Kondisi Optimum	50
V. KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran	52
DAFTAR PUSTAKA	533
LAMPIRAN	58

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik dan kandungan nutrisi cairan pulpa kakao	10
2. Desain <i>respon surface</i>	17
3. Faktor, variabel, dan taraf variabel RSM secara faktorial 2^2 pada proses fermentasi kombucha pulpa kakao	17
4. Desain percobaan 2^2 faktorial dengan 2 variabel bebas.....	18
5. Kuisisioner uji skoring minuman kombucha pulpa kakao	24
6. Kuisisioner uji hedonik minuman kombucha pulpa kakao.....	27
7. Hasil respon derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap total BAL,BAA,khamir kombucha	28
8. Hasil respon derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap total alkohol kombucha	34
9. Hasil respon derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap total padatan terlarut kombucha	38
10. Hasil respon derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap total asam kombucha.....	42
11. Hasil respon derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap uji sensori kombucha	46
12. Hasil analisa respon dari saran pertama	51
13. Anova model quadratic terhadap total BAL,BAA,khamir	59
14. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon total mikroba....	59
15. Anova model quadratic terhadap total alkohol	59
16. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon total alkohol	60
17. Anova model linier terhadap total padatan terlarut (TPT).....	60
18. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon total padatan terlarut	60

19. Anova model linier terhadap total asam	60
20. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon total asam	61
21. Anova model 2fi terhadap aroma kombucha	61
22. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon aroma kombucha	61
23. Anova model linier terhadap warna kombucha	61
24. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon	62
25. Anova model linier terhadap rasa kombucha.....	62
26. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon warna kombucha	62
27. Anova model quadratic terhadap penerimaan keseluruhan kombucha	63
28. Nilai parameter pemilihan model terhadap respon penerimaan keseluruhan kombucha.....	63
29. Solusi optimasi minuman kombucha	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman kakao	7
2. Potongan melintang buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa.....	9
3. Diagram alir proses pembuatan kombucha pulpa kakao	14
4. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao.....	20
5. Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji total Bal,BAA,khamir	31
6. Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji total alkohol.....	37
7. Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji total padatan terlarut.....	40
8. Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji total asam ...	44
9. Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji aroma kombucha	47
10. Kontur respon (a) dan respon permukaan (3D) (b) uji rasa kombucha.....	49
11. Kombinasi perlakuan optimum derajat brix dan lama waktu fermentasi pada kombucha pulpa kakao	51
12. Buah kakao MCC02.....	65
13. Pengupasan buah kakao	65
14. Pemisahan pulpa dari biji kakao	65
15. Pengukuran brix cairan pulpa	65
16. Stock cairan pulpa kakao	65
17. Kombucha teh komersial	65
18. Penyaringan cairan pulpa kakao	66

19. Sterilisasi.....	66
20. Penambahan SCOBY	66
21. SCOBY	66
22. Pendinginan pulpa kakao	66
23. Fermentasi.....	66
24. Analisa kadar alkohol.....	67
25. Uji sensori	67
26. Total asam.....	67
27. Total mikroba.....	67

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Kakao (*Theobroma cacao* Linn), yang lebih dikenal sebagai tanaman coklat, merupakan salah satu komoditas unggulan sektor perkebunan yang terus dikembangkan. Tanaman kakao memiliki peranan strategis dalam mendukung perekonomian nasional, terutama melalui peningkatan pendapatan petani, kontribusi terhadap devisa negara, dan penyediaan lapangan kerja. Namun, untuk memaksimalkan manfaat ini, diperlukan peningkatan mutu biji kakao melalui pengolahan pascapanen yang lebih baik, termasuk penerapan teknologi fermentasi untuk mencapai standar pasar internasional (Manalu, 2018). Lampung merupakan salah satu provinsi yang memiliki produksi kakao terbesar di Indonesia (Kementan, 2022). Menurut data yang diperoleh dari Kementerian Pertanian tahun 2022 produksi kakao di Provinsi Lampung mengalami peningkatan sejak tahun 2020 sampai dengan tahun 2022. Total produksi kakao di Provinsi Lampung pada tahun 2020 mencapai 57.510 ton dan berada pada posisi keempat penghasil kakao terbanyak di Indonesia.

Buah kakao umumnya diolah menjadi coklat atau minuman coklat yang diseduh atau produk-produk coklat lainnya. Selama proses pengolahan buah kakao terdapat beberapa limbah yang muncul diantaranya adalah pulpa kakao, kulit buah, dan daging buah (Kristanto, 2015). Salah satu limbah yang dihasilkan selama proses pengolahan awal kakao dan belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat adalah pulpa. Pulpa ini berupa lapisan putih yang menyelimuti biji kakao dan memiliki berat sekitar 25-30% dari total berat biji. Kandungan utama pulpa kakao meliputi 10-15% gula (yang terdiri dari sukrosa 107,60 g/l, glukosa 214,24 g/l dan fruktosa

10,60 g/l), 2-3% pentosa, 82-87% air, 1-1,5% pektin, serta 1-3% asam sitrat (Aridona, dkk., 2015). Selain itu pulpa kakao juga mengandung asam amino, protein, mineral, dan vitamin (terutama vitamin C), sehingga dapat menjadi media yang cocok untuk pertumbuhan mikroba (Putra dkk, 2017; Juniaty, 2017). Asam-asam organik tersebut terbentuk dari fermentasi gula yang terkandung dalam pulpa biji kakao. Senyawa gula yang terdapat dalam pulpa kakao dapat dimanfaatkan oleh mikroba sebagai media tumbuh sehingga lapisan pulpa terurai menjadi cairan yang encer dan keluar lewat lubang-lubang di dasar dan dinding peti fermentasi (Widyotomo dan Mulato 2008). Pulpa atau lendir kakao memiliki potensi yang cukup baik untuk diubah menjadi produk-produk pangan maupun non pangan fermentasi yang bernilai tambah tinggi. Produk fermentasi yang terbuat dari pulpa kakao antara lain minuman beer, kefir, wine/anggur dan minuman kombucha (Wulansari, 2022., Frimpong, 2015., Nunes et al., 2020)

Kombucha adalah minuman teh tradisional yang dihasilkan melalui proses fermentasi selama 7-14 hari dengan bantuan mikroorganisme seperti bakteri asam asetat dan khamir (Bhattacharya et al., 2018). Kombucha hampir umumnya dibuat dengan bahan dasar larutan teh hitam yang diberi gula pasir, namun sekarang banyak penelitian kombucha dengan menggunakan bahan baku dedaunan dan sari buah yang memiliki kandungan antioksidan serta tanin yang tinggi (Damayanthi, 2019). Menurut Nurhidayah, dkk (2018), teh kombucha dapat bermanfaat bagi tubuh dan dapat menstabilkan proses metabolisme tubuh karena senyawa-senyawa yang terdapat di dalam kombucha seperti asam, vitamin B kompleks, vitamin C, dan lain-lain. Selain itu kombucha juga dapat menurunkan berat badan dan menormalkan organ- organ tubuh. Sel antioksidan yang terdapat dalam pulpa kakao juga mampu meningkatkan daya tahan tubuh, meningkatkan stamina dan mencegah kanker serta penyakit stroke (Nurhidayah, dkk., 2018). Pada saat ini, masyarakat mulai memiliki kesadaran yang lebih mengenai pentingnya menjaga kesehatan. Sehingga ketika masyarakat memilih untuk mengonsumsi minuman, tidak hanya melihat dari aspek selera maupun rasa, melainkan masyarakat sudah mempertimbangkan kandungan nilai gizi dan fungsinya bagi kesehatan tubuh. Oleh karena itu, minuman kombucha dipilih untuk dilakukan penelitian lebih lanjut sebagai produk olahan dari pulpa kakao.

Proses pembuatan kombucha dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain lama fermentasi, derajat brix, jumlah starter yang digunakan, suhu inkubasi, pH, kadar sukrosa awal, kultur khamir dan bakteri (Ganjar dan Samsul, 2016). Penelitian telah dilakukan terkait tentang pengaruh lama fermentasi dan perbedaan derajat brix terhadap karakteristik kombucha. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Wulansari (2022) yang membuktikan bahwa lama fermentasi 8 hari berpengaruh sangat nyata terhadap karakteristik kombucha pulpa kakao (*Theobroma cacao*) yang difermentasi dengan starter simbiosis bakteri-khamir. Sedangkan hasil penelitian Marwati dkk, (2013) menyatakan bahwa teh kombucha dengan karakteristik hedonik rasa terbaik diperoleh dari perlakuan derajat brix 20%. Namun, sampai saat ini penelitian pembuatan kombucha dari pulpa kakao dengan variasi derajat brix yang berbeda belum dilakukan. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengamati pengaruh perbedaan variasi derajat brix terhadap karakteristik minuman kombucha dari pulpa kakao fermentasi dan pulpa kakao tanpa fermentasi.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh derajat brix terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao.
2. Mengetahui pengaruh lama waktu fermentasi terhadap karakteristik minuman kombucha pulpa kakao.
3. Mengetahui kombinasi terbaik antara derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap minuman kombucha pulpa kakao

1.3 Kerangka Pemikiran

Pulpa kakao memiliki kandungan gula yang cukup tinggi (glukosa 214,24 g/l, fruktosa 10,60 g/l dan sukrosa 107,60 g/l) 2-3% pentosa, 82-87% air, 1-1,5% pektin, serta 1-3% asam sitrat, sehingga dapat menjadi sumber makanan untuk pertumbuhan mikroba pada fermentasi kombucha (Juniaty, 2017).

Selama fermentasi gula-gula dalam pulpa kakao akan dimanfaatkan oleh mikroba starter kombucha untuk menghasilkan metabolit sekunder yang merupakan komponen utama produk kombucha. Fermentasi kombucha dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain derajat brix dan lama fermentasi. Menurut penelitian Marwati et al. (2013), variasi derajat brix memberikan pengaruh signifikan terhadap parameter total asam, pH, gula reduksi, total mikroba, serta tingkat kesukaan terhadap cita rasa teh kombucha. Temuan serupa juga dilaporkan oleh Nainggolan (2009), yang menunjukkan bahwa fermentasi kombucha rosela merah dengan variasi kadar gula dan durasi fermentasi memengaruhi pertumbuhan bakteri *Acetobacter* sp., produksi nata, total asam, pH, kadar alkohol, dan Total Soluble Solid (TSS). Penelitian yang dilakukan Wulansari (2022) juga membuktikan bahwa semakin lama fermentasi mempengaruhi pH, total asam, total brix, berat selulosa, total padatan terlarut, dan total mikroba pada produk kombucha yang dihasilkan. Sementara Penelitian yang dilakukan oleh Yanti et al., 2020 menyatakan bahwa derajat brix yang memiliki aktivitas anti bakteri tertinggi yaitu dengan kadar gula 20%.

Penambahan gula yang berlebihan dapat menyebabkan keracunan pada mikroba dalam proses fermentasi. Begitupun dengan lama waktu fermentasi yang dapat mempengaruhi kualitas fisik, kandungan kimia, dan rasa teh pada kombucha. Semakin lama fermentasi dilakukan, semakin banyak metabolit sekunder yang terbentuk dan semakin tinggi kadar bioetanol yang dihasilkan. Menurut Jayabalan et al. (2019), selama proses fermentasi akan terjadi peningkatan antioksidan pada teh kombucha. Pada penelitian ini akan digunakan konsentrasi kadar gula total (°brix) yang berbeda sebesar 11 °brix, 12 °brix, 14 °brix, 16 °brix dan 17 °brix. Penelitian ini juga menggunakan lama waktu fermentasi yang berbeda yaitu 2 hari, 4 hari, 8 hari, 12 hari, 14 hari. Minuman kombucha dari pulpa kakao dengan perbedaan derajat brix dan lama fermentasi ini dilakukan analisis laboratorium yang meliputi uji pH, total asam, derajat brix, total mikroba dan uji kadar alkohol. Pengamatan juga dilakukan terhadap produk kombucha komersial sebagai kontrol positif pada penelitian ini. Berdasarkan mekanisme di atas akan diperoleh derajat brix terbaik untuk menghasilkan karakteristik minuman kombucha dari pulpa kakao yang diinginkan.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Derajat brix berpengaruh terhadap karakteristik minuman kombucha yang dihasilkan dari pulpa kakao.
2. Lama waktu fermentasi berpengaruh secara signifikan terhadap karakteristik minuman kombucha yang dihasilkan dari pulpa kakao.
3. Terdapat kombinasi terbaik antara derajat brix dan lama waktu fermentasi terhadap minuman kombucha dari pulpa kakao

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kakao

Kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan tanaman yang berasal dari wilayah hutan tropis di Amerika Tengah dan bagian utara Amerika Selatan. Tanaman ini dikenal sebagai penghasil biji cokelat yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Secara umum, kakao dibagi menjadi tiga jenis utama, yaitu Forastero, Criollo, dan Trinitario, yang merupakan hasil persilangan antara Forastero dan Criollo (Moramayor, 2008). Saat ini, sebagian besar klon kakao yang dikembangkan merupakan turunan dari tipe Forastero. Kakao mulai diperkenalkan di Indonesia oleh bangsa Spanyol, tepatnya di wilayah Celebes (Sulawesi) dan Minahasa, dengan aktivitas ekspor pertama dilakukan melalui pelabuhan Manado ke Manila pada tahun 1825-1838, dengan volume ekspor mencapai sekitar 92 ton (Wahyudi et al., 2008). Menurut data Kementerian Pertanian (2020), Indonesia memiliki luas areal penanaman kakao mencapai 1,6 juta hektar yang tersebar di seluruh provinsi, sehingga pada tahun 2020 dalam setahun Indonesia mampu menghasilkan kakao sebesar 739.483 ton.

Kakao merupakan salah satu komoditas unggulan Indonesia di sektor perkebunan yang berperan penting dalam mendukung perekonomian nasional. Kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah satu-satunya spesies dalam genus *Theobroma* yang dibudidayakan secara komersial. Tanaman ini diyakini berasal dari wilayah tropis di Benua Amerika (Poedjiwidodo, 1996). Ilustrasi buah kakao dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 1. Tanaman Kakao (Indarti, 2007)

Tanaman kakao digolongkan menjadi kelompok tanaman Caulifloris, berikut sistematika tanaman kakao menurut klasifikasi secara botani :

Divisi	: Spermatophyta
Sub-devisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: Theobroma
Species	: Theobroma cacao

2.2 Pulpa Kakao

Limbah yang dihasilkan dari tanaman kakao sebagian besar berupa limbah padat. Pengelolaan limbah padat ini memerlukan pendekatan yang berbeda, tergantung pada sifatnya. Secara umum, limbah padat dapat dikelola melalui dua metode utama, yaitu dengan proses pengolahan atau tanpa pengolahan. Menurut Watson (2016) buah kakao terdiri dari 4 komponen utama. Komponen utama yang ada dalam buah kakao di antaranya kulit buah (*pod husk*) sebesar 73,7%, pulpa kakao sebesar 10,1%, plasenta 2,0%, dan biji sebesar 14,2%. Dalam pengolahan kakao, yang dimanfaatkan adalah bijinya dengan presentase hanya sebesar 14,2%. Oleh karena itu, apabila limbah-limbah sisa produksi yang dihasilkan setiap panen yang tidak dikelola dengan baik akan menimbulkan masalah. Masyarakat belum banyak mengolah limbah kakao secara keseluruhan terutama pada pulp biji kakao. Limbah pulp biji kakao yang dihasilkan masih banyak terbuang ke tanah sehingga menjadi

limbah yang dapat merusak lingkungan. Pulpa kakao adalah salah satu limbah yang muncul pada proses fermentasi kakao. Pulpa merupakan jaringan berlendir dan halus yang menyelubungi biji kakao basah (Sabahanur dan Ralle, 2018). Pulpa kakao ini menyelimuti permukaan biji kakao dengan selaput tipis dan berlendir. Pulpa kakao berbentuk sebuah lapisan endosperm. Pulpa kakao ini terdiri dari sel-sel turbuler yang mempunyai ruang antara sel yang cukup besar. Pada kondisi buah kakao yang belum matang, lapisanpulpa ini membengkak. Pada kondisi buah kakao yang sudah matang, lapisan ini akan menjadi sebuah lapisan lunak dan berlendir (Juniaty, 2017)

2.2.1 Proses Pengambilan Pulpa Kakao

Cairan pulpa merupakan hasil samping fermentasi biji kakao yang belum termanfaatkan dengan baik dan dibuang ke lingkungan sehingga menyebabkan pencemaran (Tazkiyah, 2012). Proses fermentasi buah kakao, merupakan sebuah proses alami yang terjadi dengan bantuan mikroba (Puslitkoka, 2016). Proses fermentasi biji kakao terbagi menjadi dua jenis, yaitu fermentasi internal dan fermentasi eksternal. Pada fermentasi internal, pulp kakao diuraikan oleh enzim protopektinase dengan bantuan mikroorganisme. Sementara itu, fermentasi eksternal melibatkan perubahan kimiawi, di mana senyawa polifenol dan purin dalam pulp hilang, sehingga menghasilkan cita rasa dan aroma khas yang disukai oleh konsumen (Ramlah dan Daud, 2009). Proses fermentasi ini memerlukan oksigen dari udara untuk mendukung aktivitas mikroorganisme. Mikroba memanfaatkan gula yang terdapat dalam pulp kakao (*cocoa pulp/cocoa sweating*) sebagai media pertumbuhan. Penampilan pulp kakao dapat dilihat pada Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. Potongan melintang buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa (Juniaty, 2017)

Pada proses fermentasi ini lapisan pulpa akan terurai menjadi sebuah cairan yang encer dan akan keluar melalui lubang-lubang yang telah disediakan pada kotak yang digunakan untuk proses fermentasi buah kakao. Biji kakao sebanyak 1 ton dari proses fermentasi dapat menghasilkan 75-100 liter cairan pulpa kakao dengan bau yang tidak sedap (Sulistyowati dan Soenaryo, 2015).

2.2.2 Karakteristik dan Kandungan Nutrisi Pulpa Kakao

Pulpa kakao sebagian besar terdiri dari air. Selain itu, pulpa kakao mengandung senyawa nutrisi yang terlarut, di antaranya gula dan asam-asam karboksilat, protein, vitamin dan mineral (Tabel 1). Gula menjadi senyawa yang paling banyak yang terdapat pada pulpa kakao. Lendir pulpa yang di dalamnya terkandung gula memiliki komposisi yang cukup besar sangat berperan penting terhadap proses fermentasi biji kakao. Taiga, dkk (2015) membuktikan bahwa lendir pulpa kakao yang telah dididihkan selama kurang lebih sepuluh menit mempunyai jumlah kandungan senyawa gula yang setara dengan madu lebah sehingga didihan pulpa kakao tersebut dapat digunakan sebagai sumber pemanis seperti halnya madu. Asam sitrat menjadi senyawa yang sangat penting yang terkandung dalam pulpa kakao. Pada tabel 1 dapat dilihat bahwa asam sitrat merupakan asam organik paling banyak yang terkandung dalam pulpa kakao yaitu sebesar 9,14 mg/l (Juniaty, 2017). Asam sitrat ini berperan sebagai pemberi cita rasa atau perisa tersendiri bagi pulpa kakao, sehingga dapat digunakan sebagai perisa sebuah produk minuman lain

(Chin, 2016). Tabel karakteristik dan kandungan nutrisi cairan pulpa kakao dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Karakteristik dan kandungan nutrisi cairan pulpa kakao

Parameter	Nilai
pH	3,75
Indeks reflaksi	1,358
Berat Jenis	1,067
Kadar air (%)	85,30
Kadar abu (%)	3,76
Glukosa (g/l)	214,24
Fruktosa (g/l)	10,60
Sukrosa (g/l)	107,60
Serat (g/l)	11,80
Pektin (%)	5,00
Lemak (%)	3,54
Total protein (g/l)	7,20
Asam sitrat (mg/l)	9,14
Asam maltat (mg/l)	3,60
Asam asetat (mg/l)	2,28
Asam oksalat (mg/l)	1,27
Asam laktat (mg/l)	1,23
Asam malat (mg/l)	3,60
Asam fumarat (mg/l)	0,02
Vitamin C (mg/l)	18,30
Vitamin A (mg/l)	34,15
Vitamin B1(mg/l)	19,2
Vitamin B2	1,60
K (mg/l)	950,00
Na (mg/l)	30,50
Ca (mg/l)	171,50
Mg (mg/l)	82,50
P (mg/l)	62,47
Fe (mg/l)	262,50

(Sumber: Juniaty, 2017)

2.3 Kombucha

2.3.1 Karakteristik

Kombucha adalah minuman fermentasi yang berasal dari teh manis yang difermentasi menggunakan kultur simbiotik antara bakteri dan ragi, dikenal sebagai SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast).

Kombucha memiliki karakteristik fisik, kimia, dan organoleptik yang khas, yang membedakannya dari minuman lain. Menurut Chen dan Liu (2021), proses fermentasi kombucha menghasilkan senyawa bioaktif seperti antioksidan dan probiotik yang mendukung kesehatan pencernaan dan sistem imun. Secara fisik, penampilan kombucha dipengaruhi oleh jenis bahan dasar yang digunakan, terutama jenis teh, seperti teh hitam, hijau, atau putih. Warna kombucha berkisar dari coklat muda hingga keemasan, tergantung pada durasi fermentasi dan teh yang digunakan (Tang et al., 2020). Kombucha juga memiliki sedikit karbonasi alami yang dihasilkan selama fermentasi, menciptakan sensasi gelembung halus yang menyegarkan (May et al., 2019). Kejernihan minuman ini dapat bervariasi tergantung pada penyaringan dan durasi fermentasi, dengan beberapa produk mengandung partikel kecil SCOBY yang tidak memengaruhi kualitas keseluruhan (Chakravorty et al., 2016).

Secara kimiawi, kombucha memiliki keasaman tinggi dengan pH berkisar antara 2,5 hingga 3,5, yang utamanya dihasilkan oleh asam organik seperti asam asetat, asam glukonat, dan asam laktat (Kim et al., 2019). Keasaman ini tidak hanya memberikan rasa khas kombucha, tetapi juga berfungsi sebagai pengawet alami yang memperpanjang umur simpan. Selain itu, kombucha mengandung alkohol dalam kadar rendah (biasanya di bawah 0,5%), yang diubah menjadi asam oleh bakteri selama fermentasi. Kombucha juga kaya akan senyawa bioaktif, seperti polifenol dari teh, vitamin B kompleks, dan vitamin C, yang memberikan manfaat antioksidan dan mendukung detoksifikasi tubuh (Jayabalan et al., 2019). Rasa dan aroma kombucha mencerminkan proses fermentasinya. Rasa kombucha biasanya asam-manis, dengan tingkat keasaman yang meningkat seiring lamanya fermentasi. Fermentasi selama 7–10 hari menghasilkan rasa yang seimbang antara manis dan asam, sementara fermentasi lebih lama dapat menghasilkan rasa yang lebih tajam dan asam (Yang et al., 2020). Aromanya merupakan kombinasi dari bau cuka akibat asam asetat, aroma buah-buahan dari ester yang dihasilkan oleh ragi, dan aroma teh asli yang masih bertahan. Kombucha dikenal kaya akan nutrisi dan senyawa bioaktif. Aktivitas mikroba selama fermentasi dapat meningkatkan kadar polifenol, yang mendukung aktivitas antioksidan (Kim et al., 2020).

Kombucha juga mengandung probiotik, yaitu mikroorganisme hidup yang mendukung kesehatan saluran pencernaan. Kandungan asam glukonat dalam kombucha diketahui membantu proses detoksifikasi tubuh, sedangkan vitamin yang dihasilkan selama fermentasi, seperti vitamin B dan C, memberikan manfaat kesehatan tambahan (Bottari et al., 2021).

2.3.2 Mikroba yang Berperan dalam Kombucha

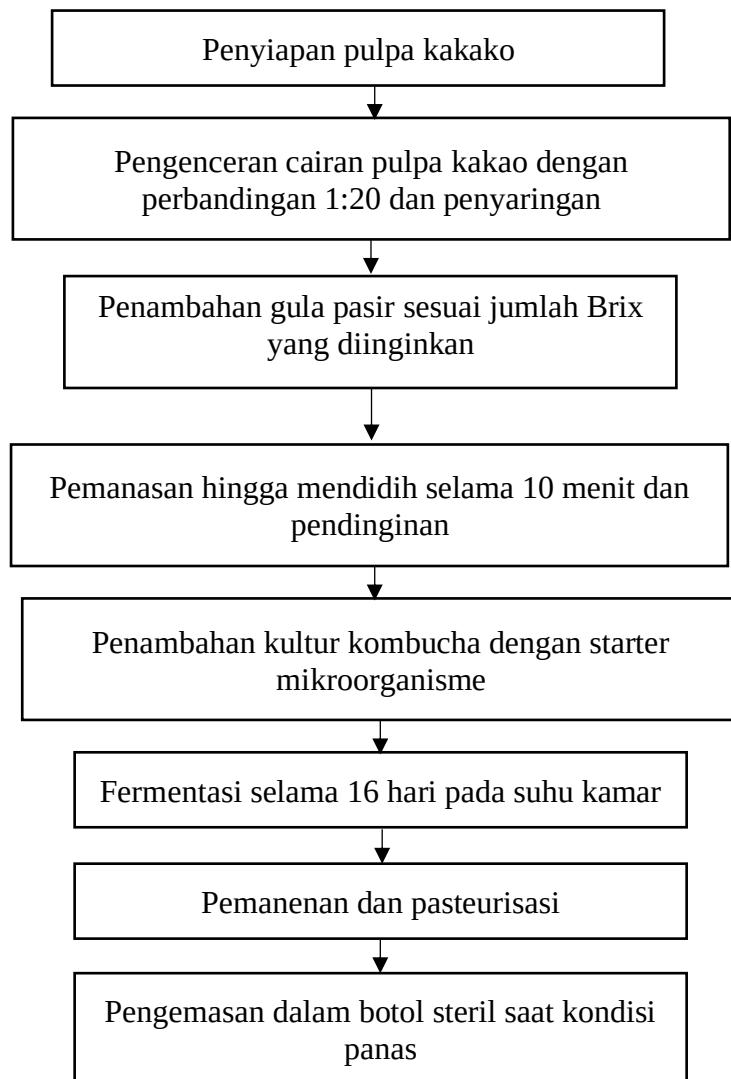
Kombucha merupakan simbiosis dari *Acetobacter*, termasuk *Acetobacter xylinum* sebagai spesies yang khas, dan berbagai khamir seperti genus *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* dan *Saccharomyces*, tergantung pada sumbernya (Frimpong, 2015). Kultur kombucha atau SCOBY (*Symbiotic Culture of Bactery and Yeast*) dalam pembuatan kombucha akan mengubah gula menjadi vitamin B dan C, asam-asam organik, enzim, dan asam amino. Komponen penting kultur kombucha dalam proses fermentasi adalah bakteri dan yeast yang dibungkus oleh selaput tipis membran permiabel (Gedela dkk., 2016). Salah satu produk hasil samping yang dapat dihasilkan adalah kombucha dari pulpa kakao. Selain teh, kombucha juga dapat dibuat dari hasil samping limbah kakao (pulpa) yang difermentasi.

Banyak manfaat kesehatan dari kombucha belum diteliti secara memadai. Awalnya teh kombucha diyakini sebagai agen detoksifikasi yang membantu kesehatan pencernaan dan juga memiliki sifat energi (Jayabalan et al., 2019). Konsumen meminum minuman kombucha untuk mendapatkan manfaat yang dirasakan, termasuk aktivitasnya terhadap kekebalan, obesitas, aterosklerosis, hipertensi, kemampuan antioksidan dan pencegahan kanker (Vina et al., 2014). Menurut Jayabalan et al., (2019), antioksidan polifenol pada kombucha bermanfaat untuk peningkatan kekebalan, pencegahan kanker, radang sendi, dan pereda inflamasi. Asam organik yang terbentuk selama proses fermentasi antara lain asam glukonat, asam asetat, asam folat, asam glukoronat, asam malonat, asam piruvat, asam oksalat, asam malat, asam laktat, asam sitrat dan tartrat yang memiliki efek dapat mencegah kontaminasi kombucha dari bakteri patogen dan sebagai antibakteri (Jayabalan et al., 2019; Neffe et al., 2017).

Selain itu, di dalam kombucha juga terdapat salah satu mineral dalam jumlah yang besar yaitu K (kalium) (Juniaty, 2017) mengungkapkan bahwa mineral kalium sangat penting untuk tubuh dalam menjaga keseimbangan muatan elektrolit yang terdapat dalam tubuh. Kalium juga sangat penting untuk sistem saraf dan kontraksi otot di dalam tubuh. Pulpa kakao memiliki jumlah kalium yang lebih tinggi dari pisang yang mengandung 350 mg K/buah (Juniaty, 2017).

2.3.3 Proses Pembuatan Kombucha dari Pulpa Kakao

Proses pembuatan kombucha dari bahan dasar pulpa buah kakao melalui beberapa tahap yaitu persiapan pulpa kakao, proses pengenceran pulpa kakao, proses penyaringan, proses penambahan gula pasir, proses pemanasan, proses pendinginan, penambahan starter bakteri yang akan digunakan, proses fermentasi, dan diakhiri dengan proses pengemasan (Yuliana., dkk., 2018). Proses pembuatan kombucha dari pulpa kakao awalnya dimulai dari menyiapkan cairan pulpa kakao yang sudah disiapkan dan dipisahkan dari biji buah kakao. Setelah itu pulpa kakao yang telah dipanen disaring dan diencerkan dengan menambahkan air kepada pulpa kakao. Air yang ditambahkan diberi perbandingan 1:20. Selanjutnya pulpa kakao yang telah diencerkan ditambahkan gula sesuai dengan nilai brix yang telah ditentukan dan dilakukan pemanasan selama 5-10 menit untuk sterilisasi cairan pulpa. Setelah itu dilakukan proses pendinginan di suhu kamar sehingga telah siap menjadi media fermentasi. Setelah media siap digunakan, ditambahkan starter mikroorganisme dan difermentasi pada suhu kamar selama 16 hari. Selanjutnya proses fermentasi akan dihentikan dengan melakukan pasteurisasi atau pemanasan selama kurang lebih 10 menit pada suhu 70-80°C. Setelah itu cairan hasil fermentasi tersebut dimasukkan ke dalam botol steril dan dikemas secara aseptik agar tidak ada kuman yang masuk (Yuliana., dkk., 2018). Diagram alir pembuatan kombucha dari pulpa kakao disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Diagram alir proses pembuatan kombucha pulpa kakao (Yuliana dkk., 2018)

2.4 Minuman Probiotik

Minuman probiotik adalah minuman yang mengandung mikroorganisme hidup, seperti bakteri asam laktat dan ragi, yang memberikan manfaat kesehatan, terutama untuk saluran pencernaan, ketika dikonsumsi dalam jumlah yang cukup. Probiotik diketahui mampu memperbaiki keseimbangan mikrobiota usus, meningkatkan sistem imun tubuh, serta membantu dalam pencegahan dan pengelolaan gangguan pencernaan dan infeksi saluran cerna (Bottari et al., 2021).

Salah satu bentuk minuman probiotik yang populer adalah kombucha, yaitu hasil fermentasi teh manis yang difermentasi menggunakan SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Kombucha mengandung bakteri asam asetat seperti *Acetobacter* dan ragi seperti *Saccharomyces cerevisiae*, yang bekerja secara sinergis untuk memfermentasi gula menjadi senyawa probiotik dan asam organik (Chakravorty et al., 2016). Kombucha juga kaya akan polifenol yang bersifat antioksidan, sehingga dapat membantu melawan stres oksidatif dalam tubuh (Jayabalan et al., 2019). Aktivitas mikroba selama fermentasi meningkatkan kadar polifenol ini, menjadikan kombucha minuman probiotik yang unggul (Kim et al., 2020).

Karakteristik organoleptik kombucha juga menjadi salah satu daya tarik utamanya. Kombucha memiliki rasa asam-manis yang menyegarkan, disertai sedikit karbonasi alami yang dihasilkan selama proses fermentasi. Kombinasi ini membuat kombucha lebih menarik dibandingkan produk probiotik lainnya (May et al., 2019). Selain itu, substrat teh yang digunakan, seperti teh hijau atau teh hitam, dapat memengaruhi kandungan probiotik dan aktivitas antioksidan kombucha, yang memberikan fleksibilitas dalam pembuatan dan cita rasanya (Tang et al., 2020). Manfaat kesehatan kombucha sebagai minuman probiotik telah banyak dibuktikan dalam penelitian. Kombucha tidak hanya mendukung kesehatan saluran cerna melalui kandungan probiotiknya, tetapi juga membantu meningkatkan imunitas tubuh, mengurangi risiko penyakit kronis, dan berkontribusi pada detoksifikasi tubuh melalui kandungan asam organik dan enzimnya (Chen & Liu, 2021; Bottari et al., 2021). Kandungan vitamin B kompleks dan C yang dihasilkan selama fermentasi juga memberikan manfaat tambahan bagi kesehatan (Kim et al., 2020). Kombinasi manfaat ini menjadikan kombucha salah satu minuman probiotik yang sangat potensial untuk mendukung kesehatan secara keseluruhan.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di beberapa laboratorium yang berada di bawah Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, yaitu Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, Laboratorium Limbah Agroindustri Pertanian, dan Laboratorium Uji Sensori. Penelitian berlangsung dari November 2022 hingga Januari 2023.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi pulpa kakao segar varietas Makasar MCC02 (Trinitario) yang diperoleh dari petani di Desa Kota Dalam, Kecamatan Way Lima, Kabupaten Pesawaran, serta Desa Umbul Karet, Lampung Timur. Selain itu, digunakan starter SCOBY komersial yang didapatkan dari Rumahku Sehat di Bekasi, gula pasir, air, NaOH, tisu, kertas label, akuades, NaCl, dan alkohol.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat kaca, *refractometer* (ATC), timbangan analitik, thermometer, pH meter (ADWA) dan lemari fermentasi. Alat yang digunakan untuk uji total alkohol adalah *ABBE refractometer*.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang diterapkan dalam penelitian ini adalah *Response Surface Methodology* (RSM) menggunakan software *Design Expert 12*, yang dilakukan dalam satu tahap fermentasi kombucha dengan variasi derajat brix (°Brix).

Desain eksperimen pada metode RSM menggunakan *Central Composite Design* (CCD), yang mencakup dua faktor: faktor pertama (P) adalah derajat brix dengan tingkat 12 °Brix (P1) dan 16 °Brix (P2), sedangkan faktor kedua (T) adalah waktu fermentasi, yaitu hari ke-4 (T1), hari ke-8 (T2), dan hari ke-12 (T3).

Percobaan ini melibatkan dua variabel bebas (independen), dengan nilai rotabilitas (α) = 1,414. *Central Composite Design* menghasilkan response surface, yang mencakup total 13 rancangan percobaan yang terdiri dari 5 titik pusat (*center point*) dan 4 titik aksial (*axial point*), seperti ditampilkan pada Tabel 2. Data variabel respons yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam melalui perangkat lunak *Design Expert* 12. Analisis ragam ini digunakan untuk menguji kecocokan dan kecukupan model yang dihasilkan.

Tabel 2. Desain *respon surface*

Central Composite Design	Total		Total
Faktor	2	Replicates	1
Base runs	13	Total runs	13
Base blocks	1	Total blocks	1
Two-level factorial Full factorial			
Cube points	4		
Center points in cube	5		
Axial points	4		
Center points in axial	0		
α: 1,414			

Tabel 3. 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	Konsentrasi Media (%) (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 4. Desain percobaan 2² faktorial dengan 2 variabel bebas

Running	Faktor 1 Konsentrasi Media (°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 : Konsentrasi Media

F2 : Waktu Fermentasi

3.4 Pelaksanaan Penelitian

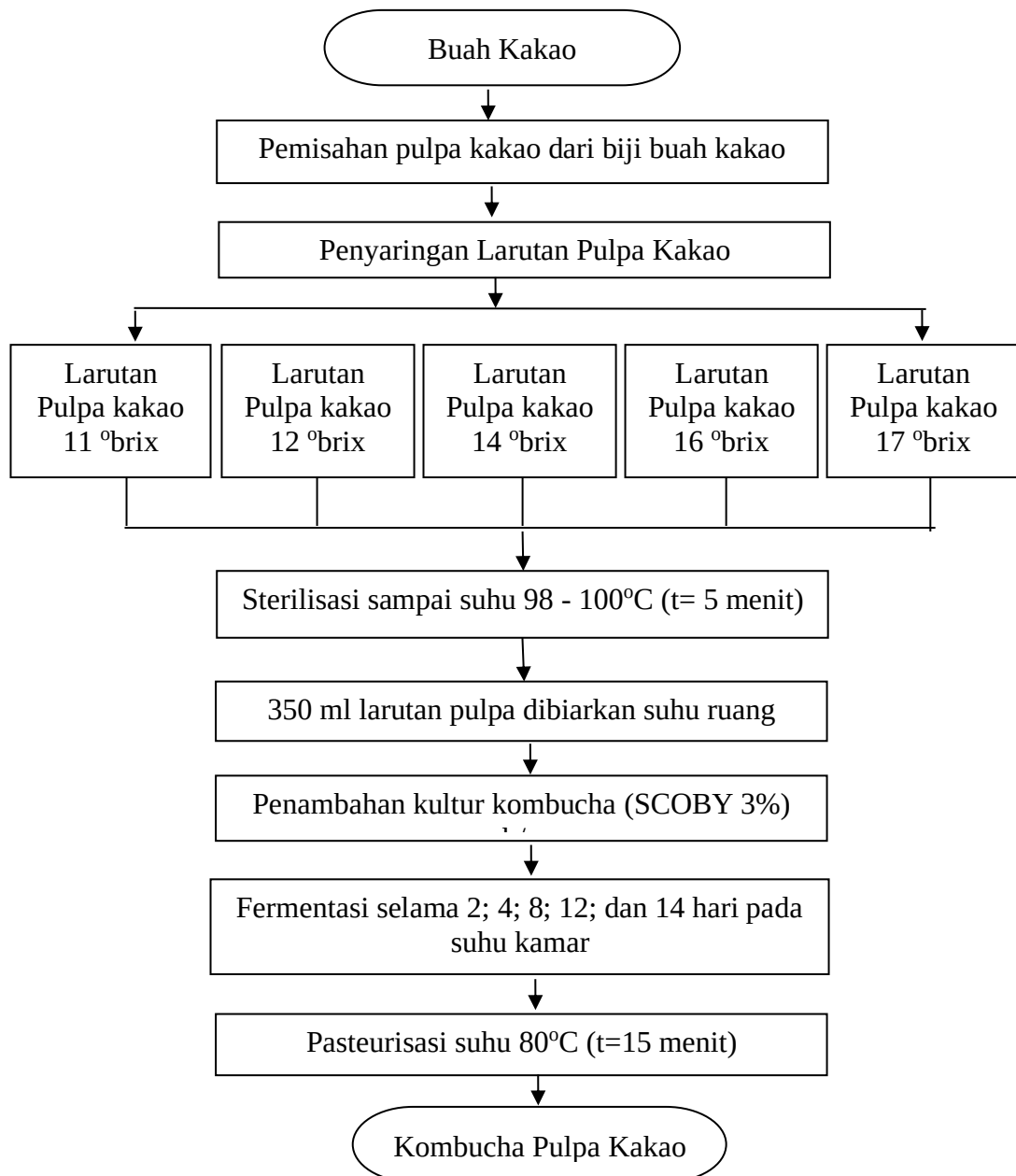
3.4.1 Penyiapan media pulpa kakao

Proses pembuatan kombucha dari pulpa kakao dimulai dengan menyiapkan cairan pulpa (dipisahkan dari biji buah kakao) sebagai media fermentasi. Pulpa kakao yang telah dipanen disaring dan 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 antaar 3,42 – 3,53. Selanjutnya masing-masing wadah berisi cairan pulpa disterilisasi dengan menggunakan kompor gas sampai suhu 100°C selama 10 menit.

Media kemudian dituang kedalam wadah steril dan ditutup rapat dan dibiarkan suhunya turun hingga suhu ruang dan siap untuk pembuatan kombucha.

3.4.2 Proses Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan dengan menambahkan starter SCOBY ke dalam campuran, kemudian wadah fermentasi ditutup rapat menggunakan kain. Selanjutnya, campuran diinkubasi untuk fermentasi pada suhu kamar dengan durasi waktu 2 hari, 4 hari, 8 hari, 12 hari, dan 14 hari. Kombucha berbahan dasar pulpa kakao yang telah selesai difermentasi kemudian dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit.. Selanjutnya media pulpa kakao dikemas dalam jar kaca dan disimpan dalam lemari pendingin. Setelah itu media diletakan pada suhu kamar dan diukur karakteristiknya (total asam, total padatan terlarut, kadar alkohol, dan total mikroba). Analisa dilakukan juga terhadap produk kombucha komersial yang berbahan baku teh sebagai perbandingan. Setelah proses fermentasi berlangsung sesuai periode perlakuan, cairan hasil fermentasi dipisahkan dari lembaran bioselulosa. Cairan fermentasi dipasteurisasi terlebih dahulu dengan proses pemanasan pada suhu 75° selama 10 menit, kemudian dimasukkan ke dalam botol steril dan dikemas secara aseptik untuk dianalisis lebih lanjut. Lembaran bioselulosa ditiriskan sampai tidak menetes, kemudian ditimbang. Khusus total mikroba, analisis dilakukan sebelum cairan fermentasi dipanaskan. Alur pembuatan kombucha dari pulpa kakao sebagai berikut (Gambar4).



Gambar 4. Diagram alir pembuatan kombucha pulpa kakao
Sumber: Wulansari (2022), telah dimodifikasi.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Total Asam

Pengujian total asam yang dilakukan dengan menggunakan metode titrasi atau disebut juga analisis volumetrik, karena adanya pengukuran volume dalam metode ini. Titrasi merupakan suatu metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi dari reaktan dengan cara melakukan analisis kimia secara kuantitatif yang dilakukan dalam laboratorium. Alat yang digunakan untuk melakukan titrasi ini adalah buret dan statif. Langkah-langkah yang dilakukan untuk mengukur total asam adalah sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 5 ml kombucha pulpa kakao dimasukkan kedalam tabung erlenmeyer
- 2) Sebanyak 2 tetes pp 1% dimasukkan ke dalam larutan kombucha tersebut
- 3) Kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuknya warna merah muda dan bertahan konstan.
- 4) Kadar asam diukur dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar asam} = \frac{V \text{ titran} \times N \text{ NaOH} \times \text{EqCH}_3\text{COOH} \times 100}{V \text{ sampel} \times 1000}$$

3.5.2 Total Padatan Terlarut

Total padatan terlarut dalam derajat brix menggunakan *hand refractometer* (0-30°Brix) (SNI, 2004). Nilai Brix digunakan untuk penentuan derajat brix, yaitu untuk menyatakan konsentrasi (% berat) atau kepadatan gula dalam larutan dan disimbolkan dengan °Bx atau °brix. Nilai Brix adalah perkiraan yang sangat baik untuk derajat brix bahan makanan cair, dalam kasus di mana gula adalah komponen kimia utama setelah air. Sebelumnya refraktometer dikalibrasi terlebih dahulu dengan aquades, kemudian sampel sebanyak 1 tetes diteteskan pada prisma refraktometer. Alat diarahkan pada sumber cahaya akan muncul batas garis biru dan

putih. Batas biru dan putih inilah yang menunjukkan derajat brix sampel. Derajat tersebut merupakan nilai yang menandakan besarnya total padatan terlarut.

Ketika menggunakan refraktometer, 10 °Brix sama dengan 10 gram gula dalam 100 gram larutan / sampel.

3.5.3 Total BAL, BAA dan Khamir

Pengujian ini dilakukan untuk mengukur jumlah koloni bakteri dalam sampel kontrol dan sampel perlakuan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). TPC dihitung dalam satuan CFU/ml (Colony Forming Units per milliliter) melalui pengenceran sampel dan penanaman pada media *Glucose Yeast Carbonat* (GYC) sebagai media tumbuh bakteri asam asetat (BAA), media MRSA sebagai media tumbuh bakteri asam laktat (BAL), dan MEA sebagai media tumbuh khamir. Prosedur dimulai dengan mengambil 1 ml sampel yang kemudian dicampurkan dengan 9 ml air fisiologis, menghasilkan pengenceran pertama dengan rasio 10^{-1} . Larutan ini kemudian dihomogenkan dengan baik. Setelah itu, sampel yang telah terencerkan pada tahap pertama diambil sebanyak 1 ml dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml air fisiologis, sehingga menghasilkan pengenceran berikutnya, yaitu 10^{-2} . Proses ini diulang secara berurutan untuk mencapai seri pengenceran yang diinginkan. Langkah-langkah pengenceran ini memastikan konsentrasi sampel yang tepat untuk menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media GYC, MRSA dan MEA. Selanjutnya, sebanyak 1 ml dari tiga seri pengenceran terakhir dipipetkan ke dalam masing-masing cawan petri yang telah disiapkan. Di atas setiap sampel yang ada di cawan petri, ditambahkan media masing-masing GYC, MRSA, dan MEA sebanyak 15 ml, yang kemudian dihomogenkan dengan cara memutar cawan petri seperti angka delapan. Cawan petri yang sudah diisi dengan sampel dan media dibiarkan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah waktu inkubasi selesai, cawan petri diambil dan koloni bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan alat *Colony Counter*. Total populasi mikroba diperoleh dari hasil penjumlahan total bakteri asam laktat (BAL), bakteri asam asetat (BAA), dan khamir.

3.5.4 Uji Kadar Alkohol

Kadar alkohol dalam minuman kombucha pulpa kakao diukur menggunakan refraktometer Abbe setelah melalui proses distilasi dengan alat distilasi Velp Scientifica UDK 149. Sebanyak 100 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung destilasi pada alat Velp, kemudian dipilih metode yang sesuai dengan karakteristik sampel.

Selanjutnya, volume sampel yang digunakan diatur, dan tombol start ditekan untuk memulai proses distilasi. Hasil distilat yang diperoleh kemudian dikumpulkan dalam wadah dan siap diukur indeks biasanya menggunakan *refraktometer Abbe*. Setelah itu, kadar alkohol dihitung menggunakan rumus yang sesuai dengan kurva standar alkohol yang telah disiapkan sebelumnya.

$$y = a(x) - b$$

3.5.5 Uji Sensori

Uji sensori merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui penerimaan konsumen pada suatu produk. Uji sensori dilakukan menggunakan uji skoring oleh panelis semi terlatih berjumlah 20 orang dan uji hedonik oleh panelis tidak terlatih berjumlah 20 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 akan diuji adalah minuman kombucha pulpa kakao. Sampel akan 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. Kuisisioner penilaian uji sensori minuman kombucha pulpa kakao dapat dilihat pada Tabel 5 dan Tabel 6.

Tabel 5. Kuisisioner uji skoring minuman kombucha pulpa kakao

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

KUISISIONER UJI SKORING

Petunjuk pengisian:
 Dihadapan Saudara/i disajikan 13 sampel minuman kombucha berbahan dasar pulpa kakao yang berkode. Saudara/i diminta untuk memberikan skor penilaian terhadap **aroma, warna, dan rasa** dengan cara memberi tanda (✓) pada masing-masing kode sampel yang sudah disediakan.

FLAVOR ASAM (AROMA)

	☐	☐	☐	☐	☐
	Tidak beraroma asam	Sedikit	Sedang	Beraroma Asam	Sangat Beraroma Asam
R1T8	☐	☐	☐	☐	☐
R2T8	☐	☐	☐	☐	☐
R3T2	☐	☐	☐	☐	☐
R4T8	☐	☐	☐	☐	☐
R5T4	☐	☐	☐	☐	☐
R6T8	☐	☐	☐	☐	☐
R7T12	☐	☐	☐	☐	☐
R8T4	☐	☐	☐	☐	☐
R9T8	☐	☐	☐	☐	☐
R10T8	☐	☐	☐	☐	☐
R11T12	☐	☐	☐	☐	☐
R12T8	☐	☐	☐	☐	☐
R13T14	☐	☐	☐	☐	☐

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

KUISIIONER UJI SKORING

Petunjuk pengisian:

Dihadapan Saudara/i disajikan 13 sampel minuman kombucha berbahan dasar pulpa kakao yang berkode. Saudara/i diminta untuk memberikan skor penilaian terhadap **aroma, warna, dan rasa** dengan cara memberi tanda (✓) pada masing-masing kode sampel yang sudah disediakan.

WARNA

☐ — ☐ — ☐ — ☐ — ☐
 Putih keruh Putih Kekuningan Kuning Kuning Kecoklatan Coklat Pekat

R1T8	☐	☐	☐	☐	☐
R2T8	☐	☐	☐	☐	☐
R3T2	☐	☐	☐	☐	☐
R4T8	☐	☐	☐	☐	☐
R5T4	☐	☐	☐	☐	☐
R6T8	☐	☐	☐	☐	☐
R7T12	☐	☐	☐	☐	☐
R8T4	☐	☐	☐	☐	☐
R9T8	☐	☐	☐	☐	☐
R10T8	☐	☐	☐	☐	☐
R11T12	☐	☐	☐	☐	☐
R12T8	☐	☐	☐	☐	☐
R13T14	☐	☐	☐	☐	☐

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

KUISIIONER UJI SKORING

Petunjuk pengisian:

Dihadapan Saudara/i disajikan 13 sampel minuman kombucha berbahan dasar pulpa kakao yang berkode. Saudara/i diminta untuk memberikan skor penilaian terhadap **aroma, warna, dan rasa** dengan cara memberi tanda (✓) pada masing-masing kode sampel yang sudah disediakan.

RASA

	☐	☐	☐	☐	☐
	Tidak berasa pahit	Sedikit Pahit	Sedang	Berasa Pahit	Sangat Pahit
R1T8	☐	☐	☐	☐	☐
R2T8	☐	☐	☐	☐	☐
R3T2	☐	☐	☐	☐	☐
R4T8	☐	☐	☐	☐	☐
R5T4	☐	☐	☐	☐	☐
R6T8	☐	☐	☐	☐	☐
R7T12	☐	☐	☐	☐	☐
R8T4	☐	☐	☐	☐	☐
R9T8	☐	☐	☐	☐	☐
R10T8	☐	☐	☐	☐	☐
R11T12	☐	☐	☐	☐	☐
R12T8	☐	☐	☐	☐	☐
R13T14	☐	☐	☐	☐	☐

Tabel 6. Kuisioner uji hedonik 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 2 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	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7T	R8	R9	R10	R11	R12	R13
	T8	T8	T2	T8	T4	T8	12	T4	T8	T8	T12	T8	T14
Aroma													
Warna													
Rasa													
Penerimaan keseluruhan													

Keterangan:

1. Sangat tidak suka
2. Tidak suka
3. Agak suka
4. Suka
5. 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.

Alasan memilih suka (berdasarkan aroma, warna, dan rasa):	Alasan memilih tidak suka (berdasarkan aroma, warna, dan rasa):

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Derajat Brix memiliki pengaruh terhadap karakteristik minuman kombucha dari pulpa kakao, terutama dalam menentukan kadar alkohol dan total asam yang dihasilkan.
2. Lama fermentasi berpengaruh signifikan terhadap jumlah mikroba, kadar alkohol, dan total asam, dengan pengaruh dominan dibandingkan derajat Brix. Semakin lama fermentasi, semakin banyak metabolit yang dihasilkan, termasuk peningkatan jumlah mikroba.
3. Kombinasi terbaik untuk menghasilkan kombucha pulpa kakao dengan kualitas optimal ditemukan pada derajat Brix 12 °Brix dan lama fermentasi 12 hari. Kombinasi ini menghasilkan kadar alkohol sebesar 0,55%, total asam sebesar 1,27%, total padatan terlarut 8,65 °brix dan total mikroba sebesar 8,37 log (x+1) CFU/mL. Kombucha berbahan dasar pulpa kakao berpotensi dikembangkan sebagai minuman kesehatan fungsional bernilai tambah tinggi, memanfaatkan limbah perkebunan kakao yang selama ini kurang dimanfaatkan.

5.2 Saran

Perlu dilakukan kombinasi perlakuan lebih lanjut pada titik yang berbeda antara derajat brix dengan lama waktu fermentasi untuk mencapai titik optimal terutama pada parameter total asam dan total padatan terlarut.

DAFTAR PUSTAKA

- Arfa Yanti, N., Ambardini, S., Ode Leni Marlina, W., Cahyanti Dwi. 2020. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Halu Oleo Kampus Hijau Bumi Tridharma, K., Kendari Sulawesi Tenggara, A., & Korespondensi, P. (n.d.). *Aktivitas Antibakteri Kombucha Daun Sirsak (Annona muricata L.) Dengan Derajat brix Berbeda (Antibacterial Activity of Soursoup Leaves Kombucha (Annona muricata L.) With Different Sugar Concentration)*.
- Aridona, M.P., Wartini, N.M dan Arnata I.W. 2015. Pengaruh Lama Fermentasi Alami Secara Aerob Cairan Pulpa Hasil Samping Fermentasi Biji Kakao Terhadap Karakteristik Cuka Fermentasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol.3(3): 82-94
- Bhattacharya, D., Ghosh, D., Bhattacharya, S., Sarkar, S., Karmakar, P., Koley, H., & Gachhui, R. (2018). Antibacterial activity of polyphenolic fraction of Kombucha against *Vibrio cholerae*: targeting cell membrane. *Letters in Applied Microbiology*, 66(2), 145–152.
<https://doi.org/10.1111/LAM.12829>
- Błaszczuk, A., et al. (2020). "The Impact of Fermentation Time on the Aroma and Taste Profile of Kombucha." *Journal of Food Science*, 85(10), 3527-3533.
- Bottari, B., Castellone, V., & Neviani, E. (2021). Probiotics and fermented foods: The art of fermentation in the post-genomics era. *Microorganisms*, 9(6), 1141. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061141>
- Chen, C., & Liu, B. Y. (2018). Effects of fermentation time and initial sugar concentration on the physicochemical properties of kombucha. *LWT-Food Science and Technology*, 96, 304-310. Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments*. John Wiley & Sons.
- Chen, C., & Liu, B. Y. (2020). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Food Science*, 85(2), 325-336.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14984>

- Chen, C., & Liu, B. Y. (2021). Health benefits and bioactive compounds of Kombucha: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1010-1026.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1753652>
- Chin, H. 2016. Cocoa Pulp Juice. *Malaysia Journal Cocoa*, 8-9.
- Christi, A. G. J. 2015. Optimasi Formula Film Berbasis Amilopektin Pati Singkong Dan Karagenan Sebagai Bahan Baku Cangkang Kapsul. Thesis. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Damayanthi, F., et al. (2019). Pengaruh Konsentrasi Gula dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Kombucha Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata L miers*). Skripsi. Universitas Pasundan Bandung.
- Frimpong, D. A. (n.d.). *Investigation of the anti-proliferative and antioxidant activities of cocoa kombucha*. <http://ugspace.ug.edu.gh>
- Gedela, M., Potu, K.C., Gali, V. L., Alyamany, K., dan Jha, K.L. 2016. A Case of Hepatotoxicity Related to Kombucha Tea Consumption. *Journal South Dakota Medicine*. Volume. 69. Nomor. 1. Halaman: 26-28.
- Ganjar, P., dan Samsul, R. 2016. Pengaruh Waktu Fermentasi terhadap Karakteristik Kombucha dari Teh Hijau. 25-50
- Huang, R., et al. (2019). Fermentation kinetics and microbial succession during cocoa bean fermentation. *Journal of Food Science*, 84(3), 502-511.
- Jafari, S. M., et al. (2020). *Fermentation conditions for kombucha production: A review*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9), e14699.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.14699>
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. (2019). *A review on Kombucha tea—Microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungi*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 538-550.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Juniaty, T. 2017. Diversifikasi Produk Berbasis Pulpa Kakao. *SIRINOV* 1(2), 57-74.
- Kementrian Pertanian. 2020. Produksi Kakao Menurut Provinsi di Indonesia tahun 2016-2020. Jakarta: Kementrian Pertanian. 1-2.
- Kementan. (2022). *Produksi Kakao Menurut Provinsi di Indonesia , 2017 - 2021* *Cocoa Production by Province in Indonesia , 2017 - 2021*. 2021, 2021.

- Kim, J., Adhikari, K., & Shin, D. (2020). Effect of fermentation on antioxidant compounds and antioxidant activities of beverages: A review. *Food Science and Biotechnology*, 29(5), 649-659.
<https://doi.org/10.1007/s10068-020-00757-y>
- Kim, J., Choi, H. J., & Park, S. H. (2019). The microbial community in Kombucha tea fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1237-1242.
<https://doi.org/10.1007/s10068-019-00639-3>
- Kristanto, P. 2015. *Ekologi Industri*. Jakarta: Penerbit Andi. 439-441.
- Liu, L., et al. (2020). "Sensory Evaluation of Kombucha: Effects of Tea Types and Fermentation Duration." *Food Control*, 108, 106884.
- Manalu, R. (2018). Pengolahan biji kakao produksi perkebunan rakyat untuk meningkatkan pendapatan petani. *Jurnal Ekonomi dan Kebijakan Publik*, 9(2), 99–111
- Marwati., Syahrumsyah, H., Handria, R. 2013. Pengaruh Derajat brix dan Starter terhadap Mutu Teh Kombucha. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Universitas Mulawarman
- May, A., Narain, N., & Kirwan, G. (2019). Sensory and consumer evaluation of fermented tea beverages: Kombucha as a potential functional food. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 739-746.
<https://doi.org/10.1007/s13197-019-03665-x>
- Moramayor, J. 2008. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. 4th edition. WileyBlackwell. United Kingdom.
- Nainggolan J. 2009. Kajian Pertumbuhan Bakteri *Acetobakter* sp. dalam Kombucha-Rosela Merah (*Hibiscus sabdariffa*) pada Kadar Gula dan Lama Fermentasi yang Berbeda. [Tesis]. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Neffe, K. B. S., Sionek, I. Scibisz, D., dan Krajewska, K. 2017. Acid Contents and the Effect of Fermentation Condition of Kombucha Tea Beverages on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties. *CyTA - J. Food*. Volume 15. Nomor 4. Halaman: 601–607.
- 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., & Uetanabaro, A. P. T. (2020). Potential Applicability of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L) as an Adjunct for Beer Production. *Scientific World Journal*, 2020.
<https://doi.org/10.1155/2020/3192585>
- Nurhidayah, Nazaruddin, dan Baiq, R. 2018. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Mutu Kombucha Sari Buah Nanas. *Jurnal Universitas Mataram*. 2-10

- Poedjiwidodo, M. S. 1996. Sambung Samping Kakao. Trubus Agriwidya. Jawa Tengah.
- Putra, G. P. G., Wartini, N. M., Darmayanti, L. P. T. 2017. Kajian Metode dan Waktu Fermentasi Cairan Pulpa pada Perubahan Karakteristik Cuka Kakao. *Jurnal AGRITECH*. Volume. 37. Nomor. 1. Halaman: 38-47.
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao. 2016. Pengolahan pulpa kakao. Puslitkoka. 1- 44.
- Ramlah dan Daud. 2009. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Warna dan Citarasa Biji Kakao. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*. Volume 1. Nomor 4. Halaman: 25
- Sabahanur, S. dan Ralle, A. 2018. Peningkatan kadar alkohol, asam dan polifenol limbah cairan pulp kakao dengan penambahan sukrosa dan khamir. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*. Volume 13. Nomor 1. Halaman: 53.
- Sulistyowati dan Soenaryo. 2015. Optimsi lama fermentasi dan perendaman biji kakao mulia. *Jurnal Pelita Perkebunan*. Volume 5. Nomor 1. Halaman: 42.
- Suroto, D. A., Utami, T., & Nugraheni, S. A. (2018). Optimasi fermentasi kombucha dengan substrat jus buah tropis. *Jurnal Teknologi Pangan*, 12(2), 91-98.
- Tazkiyah R. 2012. *Olahan kakao Indonesia*. Direktorat Jenderal Dan Pemasaran Hasil Pertanian Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Jakarta.
- Taiga, A., Afolabi, S., & Agwu, C. 2015. Comparative study of cocoa-sweat and that of pure honey. *African Journal of Biotechnology*, 2923-2925.
- Tang, W., Zhang, S., & Zhang, H. (2020). Effects of different tea substrates on the antioxidant properties of Kombucha. *LWT*, 123, 109072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109072>
- Vargas, M., et al. (2019). Health benefits and chemical composition of kombucha: A review. *Food Research International*, 116, 1273-1282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.004>
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding kombucha tea fermentation: A review. *Journal of Food Science*, 83(3), 580-588.
- Wahyudi, T., & Rahardjo, P. (2008). Sejarah dan prospek. In Wahyudi, T., Panggabean, T. R. & Pujiyanto (Eds.), *Panduan Lengkap Kakao: Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*. Jakarta: Penebar Swadaya. p. 11-37

- Wang, Y., et al. (2022). Mathematical modeling of microbial growth in fermented beverages: A response surface approach. *International Journal of Food Microbiology*, 361, 109484.
- Wang, X. 2018. Development and characteristics of green teakombucha. Thesis. Massey University. Albany, New Zealand. Pp 8-13.
- 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*. Halaman: 1-11.
- Watson, R. 2016. Chocolate in health and nutrition. Humana Press brand of Springer, New York. Pp 7-15.
- Widyotomo, S., Mulato, S., 2008. Teknologi Fermentasi dan Diversifikasi Pulpa Kakao Menjadi Produk Yang Bermutu Dan Bernilai Tambah. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia
- Wulansari, G. 2022. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Kombucha Pulpa Kakao (*Theobroma Cacao*) Yang Difermentasi Menggunakan Starter Simbiosis Bakteri- Khamir. Skripsi. Universitas Lampung
- Yang, Z. W., Ji, B. P., Zhou, F., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2019). A study on the microbiota dynamics during kombucha fermentation by metagenomic analysis. *Food Research International*, 116, 114-122.
- Yang, X., Li, W., Wang, Y., & Chen, Y. (2020). Optimizing fermentation conditions for improved flavor of Kombucha tea. *Food Research International*, 131, 108987. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108987>
- Yuliana, N. 2018. Proses Pembuatan Minuman Kombucha Pulpa Kakao. Jakarta: Sertifikat Paten Sederhana. 4-11.
- Yuliana, N., Fibra, N., Gusrisnti W., Sumardi., Endang, L. W. 2023. Total Microbe, Physicochemical Property, and Antioxidative Activity During Fermentation of Cocoa Honey Into Kombucha Functional Drink. *Applied Food Research*. Vol. (3).
- Zhao, Y., et al. (2021). Effect of fermentation time on the microbial composition and antioxidant properties of kombucha. *Food Research International*, 140, 109861. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109861>
- Zubaidah, E., Syaefudin, A., Kalsum, U., & Yunita, I. (2018). Effect of starter culture on chemical characteristics, antioxidant activity and microbial diversity of kombucha from various herbal tea leaves. *International Food Research Journal*, 25(6), 2825-2834.