

**PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK
NATA DE KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI**

(Tesis)

Oleh

Mentari Rossaline

2324051001



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

ABSTRACT

THE EFFECT OF SUGAR ADDITION ON THE CHARACTERISTICS OF NATA DE CACAO (*Theobroma cacao L.*) DURING FERMENTATION

By

MENTARI ROSSALINE

Nata de kakao was a bioseulose produced from the fermentation of cocoa pulp waste. The production process utilized the natural sugars in cocoa pulp as a carbon source for bacterial growth. This study aimed to examine the effects of sugar addition and fermentation duration on the characteristics of nata de kakao. The research employed a Completely Randomized Design (CRD) with two factors: sugar concentration (10°brix, 12°brix, 14°brix, 16°brix, and 18°brix) and fermentation time (0, 7, and 14 days). The results showed that increasing sugar concentration affected total sugar, pH, thickness, yield, and moisture content, but had no significant effect on whiteness index, color index values L, a*, b*, and hedonic tests for taste, aroma, color, texture, and overall acceptance. Longer fermentation time increased the thickness and yield of nata de kakao, while moisture content, color index values L*, a*, b*, whiteness index, sensory hedonic scores, total sugar, and pH of the fermentation medium decreased. The best treatment based on sensory tests and the De Garmo method was obtained at a sugar concentration of 18°brix and 7 days of fermentation. Overall, the combination of sugar addition and fermentation duration significantly influenced the characteristics of the nata de kakao produced.*

Keywords : fermentation, sugar, cocoa pulp kombucha, nata de cacao, cocoa pulp.

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK NATA DE KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI

Oleh

MENTARI ROSSALINE

Nata de kakao merupakan bioselulosa yang dihasilkan dari fermentasi limbah pulpa kakao. Proses pembuatannya memanfaatkan gula alami dalam pulpa kakao sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh penambahan gula dan lama fermentasi terhadap karakteristik nata de kakao. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan dua faktor, yaitu konsentrasi gula (10°brix, 12°brix, 14°brix, 16°brix, dan 18°brix) serta lama fermentasi (0, 7, dan 14 hari). Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi gula berpengaruh terhadap total gula, pH, ketebalan, rendemen, dan kadar air, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap indeks keputihan dan indeks warna nilai L*, a*, b* dan uji hedonik rasa, aroma, warna, tekstur serta penerimaan keseluruhan. Semakin lama fermentasi, ketebalan dan rendemen nata de kakao meningkat, sedangkan kadar air, indeks warna nilai L*, a*, b*, indeks keputihan, dan sensori hedonik nata de kakao serta total gula, dan pH media fermentasi menurun. Perlakuan terbaik berdasarkan uji sensoris dan metode De Garmo diperoleh pada kombinasi konsentrasi gula 18°brix dan lama fermentasi 7 hari. Secara keseluruhan, kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi memberikan pengaruh signifikan terhadap karakteristik nata de kakao yang dihasilkan.

Kata kunci : fermentasi, gula, kombucha pulpa kakao, nata de kakao, pulpa kakao.

**PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK
NATA DE KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI**

Oleh

MENTARI ROSSALINE

Tesis

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

**Pada
Program Pascasarjana Magister Teknologi Industri Pertanian
Fakultas Pertanian
Universitas Lampung**



**PROGRAM PASCASARJANA
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2025**

Judul Tesis : **PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK NATA DE KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI**

Nama : **Mentari Rossaline**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2324051001**

Jurusan/Program Studi : **Magister Teknologi Industri Pertanian**

Fakultas : **Pertanian**



Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D.
NIP. 19680225 199603 2 001

Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M. Sc.
NIP. 19881104 201903 2 014

2. Ketua Program Studi Magister Teknologi Industri Pertanian

Prof. Dr. Ir Udin Hasanudin, M.T.
NIP. 196401061988031002

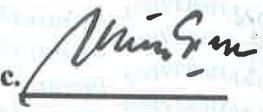
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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

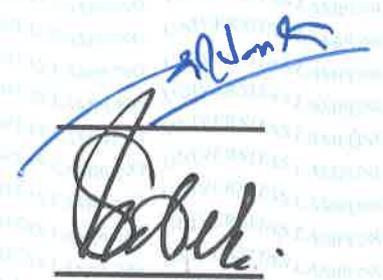


Sekretaris : Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M. Sc.



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

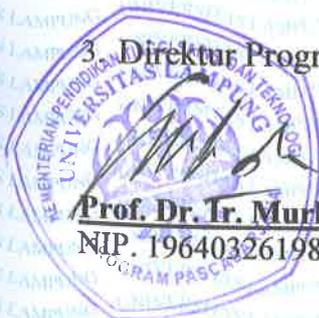
: Dr. Ir. Subeki, M.Sc.



Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P.
NIP. 196411/8 198902 1 002

3. Direktur Program Pascasarjana

Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si.
NIP. 196403261989021001



Tanggal Lulus Ujian Tesis : 15 April 2025

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan dengan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan Judul " **PENGARUH PENAMBAHAN GULA TERHADAP KARAKTERISTIK NATA DE KAKAO (*Theobroma cacao* L.) SELAMA FERMENTASI** " adalah karya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan atau pengutipan atas karya penulis lain dengan cara yang tidak sesuai etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Pembimbing penulisan tesis ini berhak mempublikasikan sebagian atau seluruh tesis ini pada jurnal ilmiah dengan mencantumkan nama saya sebagai salah satu penulisnya.
3. Hak intelektual karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Unila.

Apabila dikemudian hari ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi sesuai dengan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 22 April 2025
Yang membuat pernyataan



Mentari Rossaline
NPM. 2324051001

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 15 Juni 1996, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara, dari pasangan Bapak Rusli E dan Ibu N. Megasari. Penulis menyelesaikan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 1 Sopyono, Wonosobo, Tanggamus pada tahun 2008. Kemudian, penulis melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMP Al-Kautsar Lampung dan lulus pada tahun 2011. Pada tahun 2011, penulis melanjutkan pendidikan menengah atas di SMA Al-Kautsar Lampung dan lulus pada tahun 2014. Pada tahun 2014 penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2014 melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) lulus pada tahun 2019. Pada tahun 2023 penulis melanjutkan pendidikan Program Pascasarjana (S2) di program studi Magister Teknologi Industri Pertanian Universitas Lampung. Saat menjalani Pendidikan Pascasarjana penulis juga menjadi asisten dosen mata kuliah Mikrobiologi Dasar, Mikrobiologi Terapan dan Mikrobiologi Industri di jurusan Teknologi Hasil Pertanian.

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah Subhanahu wa ta'ala karena berkah limpahan rahmat, hidayah, dan ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini. Tesis berjudul “Pengaruh Penambahan Gula Terhadap Karakteristik Nata De Kakao (*Theobroma cacao* L.) Selama Fermentasi” merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Teknologi Pertanian di Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa tesis ini dapat diselesaikan karena bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Maka dari itu, pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M.P., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Murhadi, M.Si., selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung
3. Bapak Prof. Dr. Ir. Udin Hasanudin, M. T., selaku Ketua Program Studi Magister Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung
4. Ibu Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si.,Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Dosen Pembimbing Pertama yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, saran, nasihat, dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan tesis. Juga atas kesempatan dilibatkan dalam penelitian terkait pulpa kakao.
5. Ibu Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M. Sc. selaku Dosen Pembimbing Kedua, yang telah memberikan izin penelitian, banyak bimbingan, arahan, masukan, saran, nasihat, dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan tesis.

6. Ibu Dr. Dewi Sartika, S.T.P., M.Si. selaku Dosen Penguji Pertama, yang telah memberikan banyak bimbingan, arahan, masukan, saran, nasihat, dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan tesis.
7. Bapak Dr. Ir. Subeki, M.Sc. selaku Dosen Penguji Kedua, yang telah memberikan banyak bimbingan, arahan, masukan, saran, nasihat, dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan tesis
8. Seluruh Bapak dan Ibu dosen pengajar di program studi Magister Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung, atas ilmu, kebaikan, dan pengalaman yang diberikan selama menjalani perkuliahan.
9. Suami tercinta Agasi Ala Anarki, S.Pi, Putri-putri tercinta Ratu Anindira Maheswari dan Putri Shayra Prameswari, orang tua , serta saudara-saudari saya dan keluarga yang telah memberikan dukungan dan motivasi serta selalu menyertai penulis dalam doanya untuk melaksanakan dan menyelesaikan tesis.
10. Keluarga MTIP angkatan 2023 (Riva,Viko, Aldryan, Nazova, Bang Bastian, Puan, Sela, Inayah, Dyah, Kak Afid, Fajar) serta adik-adik S1 (Yola, Neta, Nabila, Mia, Arafah) terimakasih atas segala bantuan, semangat, dukungan, dan kebersamaannya selama ini.
11. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tesis.

Penulis berharap semoga Allah Swt. membalas kebaikan yang telah kalian berikan dan semoga tesis ini dapat bermanfaat dan berguna bagi penulis dan banyak pihak.

Bandar Lampung, 22 Maret 2025
Penulis,

Mentari Rossaline

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan	3
1.3. Kerangka pemikiran	3
1.4. Hipotesis	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Pulpa Kakao dan Produk Olahannya	6
2.2. Fermentasi.....	9
2.3. Jenis-Jenis Kultur Starter	13
2.4. Faktor-Faktor Fermentasi.....	17
2.5. Karakteristik Nata	19
2.6. Fermentasi Nata De Kakao	20
2.7. Mikroorganisme Pada Starter SCOBY	22
III. METODE PENELITIAN	27
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.2. Bahan dan Alat.....	27
3.3. Metode Penelitian	27
3.4. Pelaksanaan Penelitian	29
3.4.1. Penyiapan Pulpa Kakao Sebagai Bahan Baku Media.....	29
3.4.2. Persiapan	30
3.4.3. Pembuatan Nata De Kakao	30
3.5. Pengamatan	32

3.5.1. Pengujian Total Gula Media Fermentasi	32
3.5.2. Pengukuran pH Media Fermentasi.....	33
3.5.3. Ketebalan Nata De Kakao.....	33
3.5.4. Rendemen Nata De Kakao.....	33
3.5.5. Kadar Air Nata De Kakao.....	33
3.5.6. Indeks Warna dan Indeks Keputihan	34
3.5.7. Pengujian Sensori Hedonik.....	34
3.5.8. Penentuan Perlakuan Terbaik	38
3.8.9. Uji Scanning Electron Microscope (SEM)	38
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	39
4.1. Total Gula Media Fermentasi Nata De Kakao.....	39
4.2. pH Media Fermentasi.....	41
4.3. Ketebalan Nata De Kakao.....	43
4.4. Rendemen Nata De Kakao.....	45
4.5. Indeks Warna dan Indeks Keputihan	47
4.6. Kadar Air Nata De Kakao.....	51
4.7. Uji Sensori Hedonik Nata De kakao	52
4.8. Perlakuan Terbaik	56
4.9. Uji SEM (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)	59
V. KESIMPULAN DAN SARAN	61
5.1. Kesimpulan	61
5.2. Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi nutrisi pulpa kakao.....	7
2. Syarat mutu nata kemasan SNI 01-4317-1996.....	19
3. Tata letak kombinasi perlakuan penambahan gula dan lama fermentasi.....	28
4. Kuesioner uji hedonik nata de kakao.....	36
5. Penentuan perlakuan terbaik.....	38
6. Data analisis perlakuan terbaik.....	57
7. Analisis metode de garmo.....	58
8. Data total gula media fermentasi nata de kakao.....	69
9. Uji Barlett total gula media fermentasi nata de kakao.....	69
10. Analisis ragam total gula media fermentasi nata de kakao.....	70
11. Uji lanjut polinomial ortogonal total gula media fermentasi nata de kakao....	71
12. Data pH media fermentasi nata de kakao.....	73
13. Uji Barlett pH media fermentasi nata de kakao.....	73
14. Analisis ragam pH media fermentasi nata de kakao.....	74
15. Uji lanjut polinomial ortogonal pH media fermentasi nata de kakao.....	75
16. Data ketebalan nata de kakao.....	77
17. Uji Barlett ketebalan nata de kakao.....	77
18. Analisis sidik ragam ketebalan nata de kakao.....	78
19. Uji lanjut polinomial ortogonal ketebalan nata de kakao.....	79
20. Data rendemen nata de kakao.....	81
21. Uji Barlett rendemen nata de kakao.....	81
22. Analisis sidik ragam rendemen nata de kakao.....	82

23. Uji lanjut polinomial ortogonal rendemen pulpa kakao.....	83
24. Data indeks warna nilai L^* nata de kakao	85
25. Uji Barlett indeks warna nilai L^* nata de kakao	85
26. Analisis ragam indeks warna nilai L^* nata de kakao	86
27. Uji lanjut polinomial ortogonal indeks warna nilai L^* nata de kakao	87
28. Data indeks warna nilai a^* nata de kakao	90
29. Uji Barlett indeks warna nilai a^* nata de kakao.....	90
30. Analisis ragam indeks warna nilai a^* nata de kakao.....	91
31. Uji lanjut polinomial ortogonal indeks warna nilai a^* nata de kakao.....	92
32. Data indeks warna nilai b^* nata de kakao	95
33. Uji Barlett indeks warna nilai b^* nata de kakao	95
34. Analisis ragam indeks warna nilai a^* nata de kakao.....	96
35. Uji lanjut polinomial ortogonal indeks warna nilai b^* nata de kakao	97
36. Data indeks keputihan nata de kakao	99
37. Uji Barlett indeks keputihan nata de kakao.....	99
38. Analisis ragam indeks keputihan nata de kakao	100
39. Uji lanjut polinomial ortogonal indeks keputihan nata de kakao.....	101
40. Data kadar air nata de kakao	103
41. Uji Barlett kadar air nata de kakao.....	103
42. Analisis sidik ragam kadar air nata de kakao.....	104
43. Uji lanjut polinomial ortogonal kadar air nata de kakao.....	105
44. Data hedonik rasa nata de kakao	107
45. Uji Barlett hedonik rasa nata de kakao	107
46. Analisis ragam hedonik rasa nata de kakao	108
47. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik rasa nata de kakao.....	109
48. Data hedonik aroma nata de kakao	111
49. Uji Barlett hedonik aroma nata de kakao.....	111
50. Analisis ragam hedonik aroma nata de kakao.....	112
51. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik aroma nata de kakao	113

52. Data hedonik warna nata de kakao.....	115
53. Uji Barlett hedonik warna nata de kakao	115
54. Analisis ragam hedonik warna nata de kakao	116
55. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik warna nata de kakao	117
56. Data hedonik tekstur nata de kakao	119
57. Uji Barlett hedonik tekstur nata de kakao	119
58. Analisis ragam hedonik tekstur nata de kakao	120
59. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik tekstur nata de kakao	121
60. Data hedonik penerimaan keseluruhan nata de kakao	123
61. Uji Barlett hedonik penerimaan keseluruhan nata de kakao	123
62. Analisis ragam hedonik penerimaan keseluruhan nata de kakao.....	124
63. Uji lanjut polinomial ortogonal hedonik penerimaan keseluruhan nata de kakao	125

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa	6
2. Jalur fermentasi glukosa pada bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif	11
3. Fermentasi alkohol dari glukosa oleh khamir	12
4. Fase-fase pertumbuhan bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	24
5. Diagram alir penyiapan pulpa kakao sebagai bahan baku media	29
6. Diagram alir pembuatan nata de kakao	31
7. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap total gula media fermentasi nata de kakao	40
8. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap pH media fermentasi nata de kakao	42
9. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap ketebalan	44
10. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap rendemen	46
11. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap indeks warna nilai L* nata de kakao	48
12. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap indeks warna nilai a* nata de kakao	48
13. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap indeks warna nilai b* nata de kakao	48
14. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap indeks keputihan nata de kakao	49
15. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap kadar air	51
16. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap rasa	53
17. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap aroma	53

18. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap warna.....	53
19. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap tekstur nata de kakao	54
20. Pengaruh konsentrasi gula dan lama fermentasi terhadap penerimaan keseluruhan nata de kakao	54
21. Morfologi permukaan nata de kakao G5F7 pada perbesaran 5000 x.....	59
22. Morfologi permukaan nata de kakao perlakuan G5F14 pada perbesaran 5000 x.....	59
23. Proses pembuatan fermentasi nata de kakao	127
24. Pengujian total gula media fermentasi nata de kakao	128
25. Pengujian pH media fermentasi	129
26. Pengujian ketebalan nata de kakao	129
27. Pengujian rendemen nata de kakao	129
28. Pengujian indeks keputihan nata de kakao.....	129
29. Pengujian sensori nata de kakao	129
30. Pengujian SEM	129

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Nata adalah salah satu produk fermentasi menggunakan mikroba *Acetobacter xylinum* (Alfarisi dkk., 2021). Lapisan nata terbentuk melalui proses fermentasi oleh *Acetobacter xylinum*, yang memanfaatkan glukosa dari larutan gula. Di dalam sel bakteri, glukosa dikonversi menjadi UDP-glukosa sebagai prekursor, yang kemudian dipolimerisasi oleh enzim selulosa sintase menjadi rantai selulosa. Rantai selulosa ini diekstrusi ke luar sel dan membentuk fibril-fibril tipis. Fibril-fibril tersebut akan saling berikatan membentuk jaringan tiga dimensi, yang terus menebal seiring waktu hingga membentuk lapisan nata (Ross dkk., 1991). Salah satu contoh produk nata adalah nata de kakao (Zulfa dan Rismayanti, 2017).

Pada dasarnya pembuatan nata de kakao menggunakan limbah pulpa kakao sebagai media fermentasi dengan memanfaatkan gula yang terkandung dalam pulpa kakao sebagai sumber karbon selama pertumbuhan bakteri *Acetobacter xylinum* yang kemudian dibentuk menjadi nata atau bioselulosa (Tenriawaru dkk., 2020). Pulpa kakao memiliki kandungan gula (10%-15%) (Yuliana dkk., 2023). Kandungan gula yang tinggi menjadikan pulpa kakao dapat digunakan sebagai media fermentasi.

Selain nata de kakao, pemanfaatan pulpa kakao sebagai media fermentasi telah dilakukan untuk memproduksi berbagai produk seperti cuka kakao (Adrista dkk., 2016), minuman kesehatan cuka coklat (Hasanah dkk., 2015), jus pulpa kakao-nanas (Afolabi dkk., 2015) dan nata de kakao (Zulfa dan Rismayanti, 2017). Pada penelitian nata de kakao (Zulfa dan Rismayanti, 2017) tersebut starter yang digunakan adalah bakteri *Acetobacter xylinum* dan hanya menganalisis kandungan

kimia karbohidrat termasuk serat serta karakteristik sensori nata de kakao. Nata de kakao selain diperoleh dari fermentasi *Acetobacter xylinum* dapat juga diperoleh dari hasil biomassa SCOBY pada pembuatan kombucha. Penelitian kombucha pulpa kakao terdahulu belum melakukan pemanfaatan nata de kakao biomassa SCOBY yang dihasilkan. SCOBY terdiri dari bakteri (*Gluconicum*, *Acetobacter ketogenium*, *Pichia*, *Toluvarietas*, *Lactobacillus sp*, *Pediococcus sp*) dan *Sacharomyces ludwigii*, *S. apiculatus varietas* dan *Schizosaccharomyces pombe*) (Jamilah, 2019; Azizah dkk., 2020). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian pembuatan nata de cacao dengan starter SCOBY dan pemanfaatannya.

Selain gula, pulpa kakao juga mengandung senyawa asam organik diantaranya asam asetat dan asam laktat. Asam-asam organik tersebut berasal dari fermentasi gula yang terkandung dalam pulpa biji kakao (Putra dkk., 2017), sehingga menyebabkan cairan pulpa kakao memiliki pH yang rendah (asam). Menurut Putra dan Wartini (2014), pulpa kakao memiliki pH asam (2,90-3,67), dan pulpa kakao yang bersifat asam dapat menghambat produksi lapisan nata. Menurut Putri dkk (2021) pH media untuk memproduksi nata yaitu 4,0-6,41. Sehingga media pulpa kakao perlu penyesuaian agar dapat dimanfaatkan menjadi media fermentasi nata menggunakan SCOBY sebagai starter. Kondisi lingkungan dan gizi sebagai sumber karbon yang ideal akan mendukung aktivitas SCOBY. Untuk menghasilkan nata de kakao yang optimal, maka perlu dilakukan pengenceran cairan pulpa kakao untuk menurunkan tingkat keasamannya. Namun pengenceran pulpa mengakibatkan berkurangnya kandungan gula dalam pulpa kakao. Penurunan kadar gula dapat mempengaruhi aktivitas mikroorganisme, oleh karena itu diperlukan penambahan gula yang optimal pada proses pembuatan media fermentasi produk nata de kakao.

Menurut penelitian Rizal dkk (2013) pembuatan *nata de corn* dengan penambahan gula 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, diperoleh hasil terbaik pada penambahan gula 13%. Sedangkan pada penelitian Ummiyati dkk. (2015) *nata de ocha* diberi perlakuan penambahan gula 10%, 15%, dan 25% dengan hasil terbaik penambahan gula 15%. Selain itu pada penelitian Lestari dan Fatimah (2021) tentang *nata de soya*, dengan perlakuan penambahan gula 60 (g/l) dan 80 (g/l)

mendapatkan hasil terbaik pada penambahan gula 80 (g/l). Pada penelitian Herawaty dan Moulina (2015), pada nata timun suri dengan perlakuan penambahan gula dengan konsentrasi 4%, 6%, 8%, 10%, dan 12% mendapatkan hasil terbaik dengan perlakuan konsentrasi gula 10%. Hasil-hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa penambahan gula mempengaruhi hasil pada fermentasi nata de kakao. Selain penambahan gula, lama fermentasi juga menjadi faktor untuk memaksimalkan produksi nata de kakao. Najri dkk., (2022) melakukan fermentasi 7 hari, 14 hari dan 21 hari pada fermentasi selulosa bakteri dari kulit pisang kepok, sedangkan Nurdin dkk. (2023) melakukan lama fermentasi 6 hari, 10 hari dan 14 hari, dan Hasanela dkk., (2023) melakukan lama fermentasi 7 hari dan 14 hari pada pembuatan *nata de coco*. Berdasarkan penelitian terdahulu mengenai nata/selulosa maka penelitian ini menguji pengaruh penambahan gula (10°brix ; 12°brix; 14°brix; 16°brix; dan 18°brix) terhadap karakteristik nata de kakao dengan lama fermentasi 7 dan 14 hari

1.2. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui pengaruh penambahan gula terhadap karakteristik nata de kakao menggunakan starter SCOBY.
2. Mengetahui pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik nata de kakao yang dihasilkan.
3. Mengetahui pengaruh kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi yang menghasilkan karakteristik terbaik nata de kakao.

1.3. Kerangka pemikiran

Cairan pulpa kakao adalah salah satu limbah pengolahan kakao yang belum banyak dimanfaatkan. Pemanfaatan cairan pulpa kakao sebagai media fermentasi nata de kakao perlu penyesuaian lingkungan dan nutrisi. Permasalahan pada pulpa kakao terlalu asam dikarenakan pH berkisar antara 2,96-3,67 (Putra dkk.,

2014). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan pengenceran pada cairan pulpa kakao, namun pengenceran cairan pulpa kakao menyebabkan berkurangnya kandungan nutrisi pada cairan pulpa kakao. Kandungan nutrisi utama yang dibutuhkan yaitu kandungan gula sebagai sumber karbon. Oleh karena itu perlu penambahan gula pada pembuatan media fermentasi nata de kakao.

Media fermentasi nata de kakao dengan kandungan gula (nutrisi) yang cukup akan mendukung aktivitas mikroorganisme yang berperan dalam pembentukan lapisan-lapisan nata. Kandungan gula beragam tergantung bahan baku pembuatan nata. Penelitian *nata de ocha* diberi perlakuan penambahan gula terbaik adalah 15% (Ummiyati dkk., 2015). Pada penelitian *nata de soya* mendapatkan hasil terbaik pada penambahan gula 80 g/l (Lestari dan Fatimah, 2021). Pada penelitian nata timun suri, mendapatkan hasil terbaik dengan perlakuan konsentrasi gula 10% (Herawaty dan Moulina, 2015). Berdasarkan hasil dari beberapa penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa penambahan gula secara signifikan mempengaruhi kualitas nata yang terbentuk. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan variasi penambahan gula sebesar 10°brix, 12°brix, 14°brix, 16°brix, dan 18°brix untuk mengetahui perlakuan terbaik dalam menghasilkan nata de kakao berkualitas. Selain itu, lama fermentasi juga menentukan karakteristik nata yang dihasilkan (Putri dkk., 2021). Secara umum lama fermentasi yang dilakukan yaitu 7 hari dan 14 hari, misalnya nata dari kulit pisang kepok 7-21 hari (Najri dkk., 2022) dengan hasil terbaik pada fermentasi 14 hari. Fermentasi nata de coco selama 6-14 hari (Nurdin dkk., 2022) dan 7-14 hari (Hasanela dkk., 2023) dengan hasil terbaik 14 hari. Media fermentasi mempengaruhi nata de kakao yang dihasilkan.

Aktivitas mikroorganisme optimal pada media yang ideal akan menghasilkan nata de kakao dengan karakteristik yang sesuai. Cairan pulpa kakao sebagai media fermentasi akan dilakukan pengamatan terlebih dahulu meliputi total gula dan pH. Karakteristik nata de kakao yang akan dianalisis pada penelitian ini yaitu rendemen, ketebalan, indeks keputihan, kadar air, dan uji sensori hedonik (warna, aroma, rasa), penentuan perlakuan terbaik dan uji SEM.

1.4. Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini yaitu :

1. Penambahan gula berpengaruh signifikan terhadap karakteristik nata de kakao yang dihasilkan.
2. Lama fermentasi 7 hari dan 14 hari berpengaruh signifikan terhadap karakteristik nata de kakao yang dihasilkan.
3. Kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi yang sesuai menghasilkan karakteristik terbaik nata de kakao.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pulpa Kakao dan Produk Olahannya

Pulpa kakao merupakan lapisan lendir berwarna putih atau kuning pucat yang menyelimuti permukaan biji kakao. Pulpa kakao didapat dari proses pemanenan buah kakao yang kemudian buah dibuka dan biji dikeluarkan bersama pulpanya yang berlendir (Rojo-Poveda dkk., 2020). Pada saat pemanenan, buah dipecah dan dikeluarkan kemudian biji kakao yang diselimuti pulpa ditempatkan ke dalam keranjang atau wadah berlubang. Biji kakao yang sudah ada didalam wadah kemudian diberi beban berat diatas tumpukan biji kakao, sehingga cairan pulpa kakao menetes terpisah dari biji kakao (Yuliana dkk., 2022).



Gambar 1. Buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa
Sumber : Dokumentasi Pribadi

Cairan pulpa kakao yang keluar berwarna putih sedikit keruh. Cairan pulpa kakao memiliki karakteristik dan sensori rasa manis dan rasa asam. Cairan pulpa kakao memiliki berbagai kandungan nutrisi seperti 80-86% pulpa kakao terdiri dari air dan sisanya adalah padatan dengan komposisi utama karbohidrat,

lemak, dan mineral (Yuliana dkk., 2022). Kandungan nutrisi pulpa kakao disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi nutrisi pulpa kakao

Komponen	Kandungan Rata-rata (%)
Air	80-86
Glukosa	2,13-21,4
Sukrosa	2,13-4,06
Fruktosa	1,06-4,42-
Karbohidrat	19,50
Lemak	1,45
Protein	0,62
pH	3,50
Kalsium (mg/L)	171,5
Magnesium (mg/L)	82,5
Fosfor (mg/L)	62,47
Pektin	0,51

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

Cairan pulpa kakao memiliki kandungan air 80-86% dan sisanya padatan dengan komposisi utama karbohidrat berupa gula total, serat kasar, pektin, sedikit lemak, dan mineral yang dinyatakan sebagai kadar abu. Produk olahan yang dihasilkan dari cairan pulpa kakao yaitu : kombucha, nata de kakao, bioethanol, asam asetat, dan cuka pulpa kakao.

1. Kombucha

Menurut penelitian Yuliana dkk. (2019), pulpa kakao mengandung gula alami seperti glukosa, fruktosa, dan sukrosa, yang mendukung fermentasi dengan menyediakan nutrisi bagi mikroorganisme. Gula membantu produksi asam organik, yang memberikan rasa asam khas kombucha. Proses pembuatan kombucha melibatkan SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), yang merupakan campuran simbiotik antara bakteri dan khamir. Proses pembuatan kombucha pulpa kakao meliputi pengenceran pulpa kakao, penambahan gula pasir, *sterilisasi*, pendinginan, penambahan starter, fermentasi, pemanenan dan *pasteurisasi*. Diverfifikasi kombucha pulpa kakao dilakukan oleh Ninda (2022), dengan

penambahan rempah jahe merah dan Syari (2022), dengan penambahan rempah kayu manis.

2. Nata de kakao

Menurut penelitian Nurfaillah dkk. (2018), pengolahan pulpa biji kakao dapat menjadi produk pangan Nata de kakao yang memiliki nilai ekonomis. Proses pembuatan Nata de kakao melibatkan kultur bakteri asetat asetat untuk mengubah gula dalam pulpa kakao menjadi asam asetat, yang selanjutnya membentuk selulosa yang padat dan transparan, lapisan jeli yang kenyal, yang disebut nata de kakao. Menurut Biyantoro (2017), proses pembuatan nata de kakao meliputi pengenceran pulpa kakao, penyaringan pulpa, perebusan pulpa, penambahan *nutrien*, pendinginan, penambahan starter, fermentasi, pemanenan nata de kakao, dan penetralan nata de kakao.

3. Bioetanol

Menurut penelitian Saputri dkk. (2021), pulpa kakao memiliki kandungan gula yang cukup tinggi, sehingga dapat digunakan sebagai bahan dasar alternatif dalam pembuatan bioetanol. Pada tahap fermentasi, ragi *Saccharomyces cerevisiae* berperan dalam memecah glukosa menjadi etanol dan karbon dioksida.

4. Asam asetat

Menurut penelitian Mahadewi dkk. (2014), cairan pulpa kakao mengandung asam asetat, asam laktat, dan alkohol yang berasal dari fermentasi gula dalam pulpa biji kakao. Kandungan asam asetat tersebut menjadikan cairan pulpa kakao berguna sebagai sumber asam asetat sehingga memiliki nilai ekonomis yang tinggi.

5. Cuka pulpa kakao

Menurut penelitian Putra dkk. (2017), pulpa kakao mengandung asam asetat dan alkohol, dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan cuka fermentasi (*vinegar*). Menurut Lehninger (1982), proses pembuatan

vinegar ini melibatkan dua tahap fermentasi. Tahap pertama melibatkan konversi gula menjadi etanol (alkohol) melalui jalur fermentasi alkohol, yang dipandu oleh khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Tahap kedua, etanol dioksidasi menjadi asetaldehida dan kemudian mengalami oksidasi lebih lanjut oleh asetaldehida dehidrogenase untuk membentuk asam asetat, tahap ini dilakukan oleh bakteri *Acetobacter aceti*

2.2. Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suryani, 2017). Mikroorganisme membutuhkan sumber energi untuk hidup dan menjalani metabolismenya. Bahan baku energi yang banyak digunakan oleh mikroorganisme adalah glukosa. Beberapa mikroorganisme membutuhkan oksigen untuk memecah glukosa dan menghasilkan air, karbondioksida dan sejumlah besar energi (ATP) yang digunakan untuk tumbuh disebut mikroorganisme aerobik. Pada beberapa mikroorganisme ada juga yang tidak membutuhkan oksigen untuk mencerna bahan baku energinya (Suprihatin, 2010), mikroorganisme ini disebut mikroorganisme anaerobik.

Beberapa jenis mikroorganisme yang umumnya terlibat pada fermentasi bahan pangan adalah bakteri, khamir, dan kapang. Mikroorganisme yang memfermentasi bahan pangan dapat menghasilkan produk-produk fermentasi yang diinginkan seperti produk fermentasi yogurt, tempe, kombucha, dan tempoyak. Proses fermentasi bahan pangan umumnya menghasilkan produk akhir metabolik seperti asam laktat, asam asetat, yang dihasilkan bakteri pembentuk asam dan beberapa alkohol yang dihasilkan khamir.

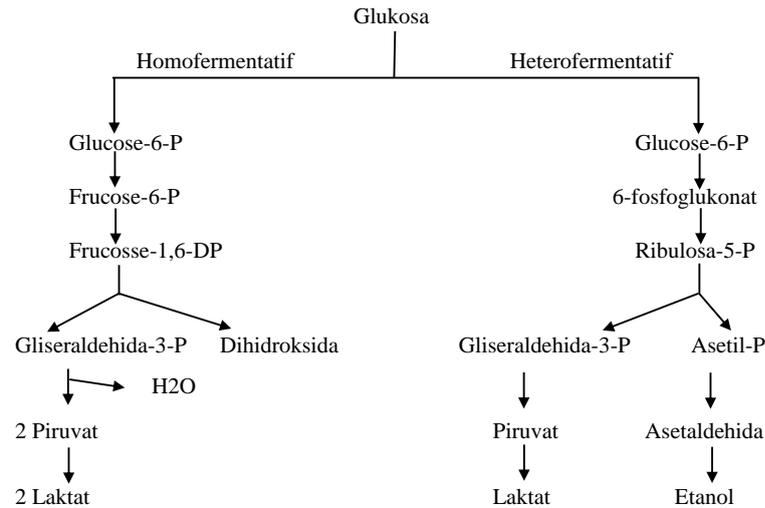
Jenis - jenis mikroorganisme yang berperan dalam teknologi fermentasi adalah:

1. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat terdiri dari 4 genera, yaitu *Lactobacillus*, *Leconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Keempat genera membentuk genera-genera

baru, antara lain *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weisella* (Bintsis, 2018). Bakteri asam laktat menggunakan gula sebagai sumber karbon dan sumber energi utama. Dalam metabolisme glukosa, BAL diklasifikasikan berdasarkan jalur fermentasinya yaitu homofermentatif atau heterofermentatif. BAL homofermentatif memfermentasi gula melalui jalur *Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP) menjadi piruvat yang selanjutnya dikonversi oleh enzim *laktat dehydrogenase* (LDH) menjadi asam laktat. BAL yang tergolong homofermentatif berasal dari genus *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, dan sejumlah spesies dari *Lactobacillus*. BAL homofermentatif hanya menghasilkan asam laktat. Hal tersebut berbeda dengan BAL heterofermentatif yang tidak hanya menghasilkan asam laktat, tetapi menghasilkan produk lain seperti etanol, asetat atau glukosa. Fermentasi BAL heterofermentatif berlangsung melalui jalur pentosa fosfat. Contoh BAL heterofermentatif yaitu *Leuconostoc*, *Oenococcus*, dan beberapa spesies *Lactobacillus*. Media yang mengandung BAL heterofermentatif akan menampilkan gelembung, sedangkan media yang mengandung BAL homofermentatif tidak menampilkan gelembung (Halasz, 2009).

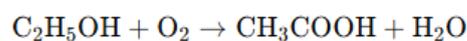
Reaksi kimia fermentasi glukosa diubah menjadi piruvat selama glikolisis dan menghasilkan 2ATP dan reduksi-NAD menjadi NADH. Piruvat direduksi menjadi laktat oleh NADH dan dihasilkan NADH⁺. Jalur fermentasi glukosa pada bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Jalur fermentasi glukosa pada bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif (Nuraida dkk., 2022)

2. Bakteri Asam Asetat

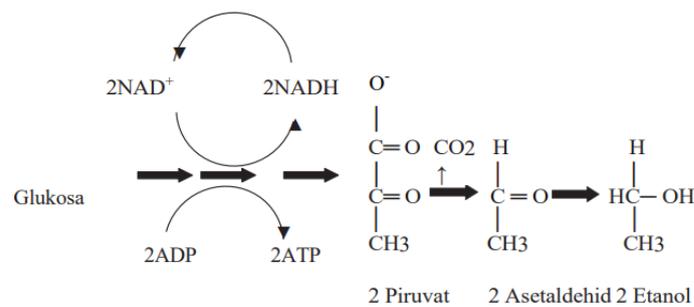
Bakteri asam asetat merupakan kelompok bakteri Gram negatif yang mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. Bakteri asam asetat juga digunakan untuk memproduksi metabolit lain misalnya asam glukonat, L-sorbosa, dan selulosa. Oksidasi etanol menjadi asam asetat seperti pada wine, bir, dan minuman beralkohol lainnya sehingga menyebabkan rasa asam. Bakteri asam asetat diklasifikasikan menjadi 19 genera, meliputi *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Bombella*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Glucon*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Saccharibacter*, *Swaminathania*, *Swingsia* dan *Tanticharoenia* (Gomes dkk., 2018). Bakteri asam asetat ditemukan dalam golongan *Acetobacter* sebagai contoh *Acetobacter aceti*. Metabolisme bakteri asam asetat lebih bersifat aerobik. Bakteri asam asetat memiliki kemampuan dalam mengoksidasi alkohol dan karbohidrat lainnya menjadi asam asetat contohnya dalam pembuatan cuka. Reaksi kimia pembentukan asam asetat oleh bakteri asam asetat sebagai berikut :



3. Khamir

Khamir berperan dalam fermentasi dengan metabolismenya adalah etanol. Contoh jenis mikroorganisme khamir adalah *Saccharomyces cerevisiae*,

merupakan jenis khamir utama yang berperan dalam produksi minuman beralkohol seperti roti, bir dan anggur. *Saccharomyces cerevisiae* merubah gula menjadi etanol dan CO₂. Pada proses fermentasi (respirasi anaerobik). Selain gas CO₂ dan alkohol, perombakan gula oleh khamir selama fermentasi juga menghasilkan produk metabolit sekunder berupa komponen flavor yang dapat menimbulkan dampak signifikan terhadap aroma dan rasa. Menurut Mehta dkk (2012) proses fermentasi alkohol diawali dengan degradasi heksosa (glukosa, fruktosa) menjadi asam piruvat melalui proses glikolisis oleh khamir. Selanjutnya, asam piruvat tersebut diubah menjadi asetilodehid melalui proses dekarboksilasi oleh enzim dekarboksilase piruvat. Asetilodehid kemudian diubah menjadi etanol dengan bantuan enzim alkohol dehydrogenase. Reaksi pemecahan gula menjadi alkohol eksotermis dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Fermentasi alkohol dari glukosa oleh Khamir (Kustyawati, 2018)

4. Kapang

Kapang merupakan fungi multiseluler yang membentuk filamen dan pertumbuhannya pada makanan tampak seperti kapas. Kapang membentuk jalinan filamen yang disebut hifa. Hifa kemudian berkembang membentuk filamen, kemudian filamen-filamen tersebut membentuk satu kesatuan yang disebut miselium. Kapang tumbuh dengan cara memperpanjang hifa dan menembus substrat. Selain miselium, tubuh/ badan vegetative kapang yang disebut *thallus* juga terdiri dari bagian yang disebut spora. Pembentukan spora, baik secara seksual ataupun aseksual, dapat diamati pada beberapa bagian hifa. Ribuan spora aseksual dapat dihasilkan dari satu hifa. Suhu pertumbuhan kapang sekitar 20-30°C dengan pH 5-6 (Uraz dan Ozer, 2014; Kuka dkk., 2022).

Menurut Uraz dan Ozer (2014) bahwa kapang dapat dibagi menjadi 2 kelompok besar yaitu hifa bersekat contohnya *penicillium glaucoma* dan tanpa sekat contohnya *Mucor mucedo*. Kapang memerlukan air, mineral, sumber karbon, dan nitrogen untuk pertumbuhannya. Produk fermentasi pangan yang menggunakan kapang contohnya tauco memanfaatkan spesies *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus Oryzae*, dan *Aspergillus oryzae* (Nuraida, 2019). Selain itu kapang juga berperan dalam pembuatan produk kecap adalah *Aspergillus sojae* (Meutia, 2015). Produk tempe juga memanfaatkan spesies *Rhizopus* yaitu *Rhizopus oligosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrhizua*, dan *Rhizopus stolonifera* (Nuraida, 2019).

Berdasarkan sumber mikroorganisme, proses fermentasi dibagi menjadi dua yaitu: fermentasi spontan dan fermentasi tidak spontan. Fermentasi spontan adalah fermentasi yang dalam terjadi tanpa ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi, tetapi mikroorganisme yang berperan aktif dalam proses fermentasi berkembang baik secara spontan karena lingkungan hidupnya dibuat sesuai untuk pertumbuhan mikroorganismenya, contohnya fermentasi sayur asin. Sedangkan fermentasi tidak spontan adalah fermentasi yang terjadi ketika ditambahkan mikroorganisme dalam bentuk starter atau ragi. Mikroorganisme akan tumbuh dan berkembangbiak secara aktif merubah bahan yang difermentasi menjadi yang diinginkan, contohnya pada pembuatan tempe dan oncom (Suprihatin, 2010).

2.3. Jenis-Jenis Kultur Starter

Kultur starter merupakan mikroorganisme hidup yang digunakan untuk proses fermentasi, mengubah komposisi kimia, menghasilkan senyawa spesifik, dan mengubah karakteristik sensori substrat. Kultur starter terdiri dari bakteri, khamir, kapang, atau campuran lebih dari dua jenis mikroorganisme yang disesuaikan dengan produk fermentasi yang akan dibuat. Karakteristik kultur starter yang diinginkan diantaranya mampu tumbuh dalam waktu singkat, memiliki aktivitas fermentasi sesuai dengan yang ditujukan, menghasilkan karakteristik sensori, serta aman (Kandasamy dkk., 2018).

Pada awalnya kultur starter dibuat dengan menumbuhkan kultur murni pada susu steril pada fermentasi susu. Namun kultur cair memiliki umur simpan yang lebih pendek, sehingga untuk menjaga aktivitas dan viabilitas kultur starter dikembangkan dengan teknik pembekuan dan pengeringan kultur starter. Teknik pembuatan kultur starter kering yang paling banyak digunakan adalah teknik pengeringan beku. Saat ini kultur starter yang dijual secara komersil dalam bentuk cair, beku, dan liofilisasi (dikeringkan dengan pengeringan beku). Proses produksi kultur starter mencakup pengembangan produksi kultur stok, penyiapan media, kultivasi kultur stok sampai mencapai densitas tertentu, pemanenan, peningkatan konsentrasi sel, serta pengawetan kultur untuk mempertahankan viabilitasnya dengan pembekuan atau pengeringan. Berikut jenis-jenis kultur starter berdasarkan bentuknya yaitu :

1. Kultur starter cair

Proses isolasi pada kultur cair melibatkan pengambilan sumber isolat yang mengandung populasi campuran dan memberikan kondisi yang cocok untuk pertumbuhan jenis mikroorganisme yang diinginkan. Isolasi mikroorganisme pada pengayaan kultur cair menjadi salah satu teknik yang berhasil meningkatkan jumlah mikroorganisme yang diinginkan atau mengoptimalkan pertumbuhan mikroorganisme yang lambat sehingga menjadi lebih mudah diisolasi. Keunggulan starter cair yaitu proses pembuatannya lebih cepat karena tanpa proses pengeringan, dan serapan sel tinggi. Starter cair mengandung mikroba aktif, fase lag pendek sehingga fermentasi akan lebih cepat. Starter cair memiliki kelemahan waktu penyiapan dengan penggunaan terlalu lama akan menurunkan populasi sel mikroba didalam kultur cair (Misgiyarta dkk., 2019). Sebagai contoh pada produksi starter cair BAL dilakukan dengan menyiapkan starter cair BAL dengan mengambil 1 ose koloni BAL berumur 24 jam lalu dimasukan ke dalam 10 ml MRSB pada botol Duran. Kultur cair diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan setelah dinkubasi kultur cair dipipet sebanyak 10% (v/v) kedalam media MRSB 50 ml selanjutnya starter dapat digunakan untuk fermentasi (Suyono, 2024).

2. Kultur Starter Enkapsulasi

Metode enkapsulasi kultur bakteri yang sering digunakan yaitu pengeringan beku (*freeze drying*) dan pengeringan semprot (*spray drying*). Keberhasilan proses enkapsulasi dipengaruhi oleh jenis matriks yang digunakan. Matriks merupakan bahan enkapsulasi yang digunakan untuk penyalut dan melapisi bakteri pada proses enkapsulasi (Nazzaro dkk., 2012). Mikroenkapsulasi merupakan proses pembuatan mikrokapsul dari bahan aktif berbentuk padat, cair, ataupun suatu disperse dengan suatu lapisan tipis pengkapsul yang berfungsi mencegah kerusakan sel mikroba dari pengaruh lingkungan. Pengkapsulan sel dapat meningkatkan daya hidup dan stabilitas mikroba selama proses produksi, penanganan, dan penyimpanan. Penelitian yang dilakukan Champagne (1995) menghasilkan peningkatan kestabilan aktivitas kultur *Bifidobacterium longum* setelah pengeringan *spray drying* pada enkapsulasi dengan bahan pengkapsul dekstrin.

3. Kultur Starter Bubuk

Proses pembuatan kultur starter bubuk yaitu dengan metode pengeringan. Contoh proses pembuatan kultur starter bubuk pada pembuatan starter tempe yang disebut laru tempe. Laru tempe dibuat dari nasi atau tepung beras atau yang ditumbuhi kapang tempe seperti *Rhizopus sp*, lalu dikeringkan dan digiling. Selain itu, penelitian Antara (2009) melakukan proses produksi bubuk inokulum kultur murni *Pediococcus acidilactici* U318 dengan menggunakan oven vakum. Proses produksi bubuk inokulum diawali dengan mencampurkan inokulum cair *Pediococcus acidilactici* U138 dengan skim dengan rasio 10:1, kemudian diaduk secara aseptis sampai homogen dan dilanjutkan dengan pencampuran tepung. Setelah pencampuran kemudian dikeringkan didalam oven vakum pada suhu 45°C dan waktu 7-8 jam. Setelah kering produk dihaluskan dijadikan bubuk kemudian dikemas didalam plastik (polietilen) dan disimpan pada suhu 10 °C.

Pemanfaatan kultur starter dalam dunia pangan sudah banyak dilakukan. Kultur starter yang digunakan dapat meningkatkan citarasa, aroma, warna, tekstur bahkan memperpanjang umur simpan. Kultur starter setiap produk berbeda-beda tergantung dengan jenis media fermentasi yang digunakan untuk

menciptakan produk tertentu. Beberapa kultur starter yang digunakan pada produk pangan yaitu kultur starter produk susu, kultur starter produk daging, kultur starter produk sayuran, kultur starter produk makanan dan minuman berbasis biji-bijian, kultur starter produk berbasis ikan dan udang dan kultur starter produk berbasis ekstrak daun dan buah.

4. Kultur Starter Produk Susu

Pada produk fermentasi susu starter yang digunakan sebagian besar berasal dari jenis *Lactobacillus* seperti *Lactobacillus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactococcus lactis* dan *Lactobacillus Plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*. Selain itu *Streptococcus salivarius* juga digunakan dalam pembuatan yogurt (Goldin dan Gobach, 1999).

5. Kultur Starter Produk Daging

Produk daging saat ini menggunakan kultur starter untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen dan menekan perkembangan mikroorganisme pembusuk (Suskoval dkk., 2010; Wang dkk., 2013). Starter produk daging didapat dari berbagai jenis bakteri seperti *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* dan *Enterococcus* (Fraqueza dkk., 2016). Selain itu *Micrococaceae* dan *Kocuria spp* digunakan pada fermentasi sosis (Cocconcelli dan Fontana, 2015). Starter daging juga menggunakan jenis ragi seperti *Debaryomyces spp.* dan *Candida spp.* (Laranjo dkk., 2017).

6. Kultur Starter Produk Sayuran

Produk sayuran menggunakan kultur starter untuk memperpanjang masa simpan maupun menghasilkan produk akhir yang diinginkan, contohnya pada fermentasi kimchi dan sauerkraut menggunakan *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactiplantibacillus*, dan *Levilactobacillus brevis*. Pembuatan acar menggunakan *Pediococcus cereviciae*, *Lactobacillus plantarum* (Apriyanto, 2021).

7. Kultur Starter Produk Makanan dan Minuman berbasis biji-bijian

Beberapa starter digunakan untuk membuat produk makanan seperti kecap menggunakan *Aspergillus oryzae* dan *Aspergillus sojae*. Produk tempe

menggunakan *Rhizopus oligosporus* dan nata de kakao menggunakan *Acetobacter xylinum*. Pada produk fermentasi kombucha menggunakan starter SCOBY (Apriyanto, 2021).

8. Kultur Starter Produk Berbasis Ikan dan Udang

Fermentasi berbasis ikan dan udang dilakukan untuk memperpanjang umur simpan maupun cita rasa pada produk akhir yang diinginkan. Contohnya pembuatan terasi menggunakan *Bacillus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, dan *Micrococcus* (Apriyanto, 2021).

9. Kultur Starter Produk berbasis Ekstrak Daun dan Buah

Fermentasi berbasis ekstrak daun dan buah menghasilkan produk fermentasi memiliki nilai ekonomis. Contohnya pembuatan teh kombucha menggunakan SCOBY (Lestari dkk, 2020), Cuka buah menggunakan bakteri asam asetat (Idayanti dkk, 2022), dan asinan buah menggunakan bakteri asam laktat (Dianti dkk., 2023)

2.3. Faktor-Faktor Fermentasi

Fermentasi dapat dilakukan dengan memperhatikan lingkungan mikroorganisme untuk beraktivitas sehingga menghasilkan produk yang diinginkan. Menurut Apriyanto dkk. (2021) beberapa faktor yang dikendalikan yaitu:

1. Derajat keasaman/ pH

pH sangat mempengaruhi lingkungan pertumbuhan mikroba sehingga pH harus disesuaikan dengan jenis mikroba yang akan beraktivitas.

2. Suhu

Suhu mempengaruhi masa fermentasi dikarenakan mikroba memiliki kriteria pertumbuhan yang berbeda-beda, contohnya *Saccharomyces cerevisiae* akan tumbuh optimal pada suhu 30-35 C dan puncak produksi alkohol dicapai pada suhu 33 C. Jika suhu terlalu rendah, maka fermentasi berlangsung lambat, tetapi jika suhu terlalu tinggi maka mikroba akan mati sehingga proses fermentasi tidak dapat berlangsung.

3. Substrat (medium)

Substrat merupakan bahan baku fermentasi yang mengandung nutrient-nutrient yang dibutuhkan mikroba untuk tumbuh maupun menghasilkan produk fermentasi. Karbohidrat salah satu sumber karbon yang dibutuhkan mikroba, selain itu nutrisi lain yang dibutuhkan seperti protein, nitrogen, sulfur, mineral, dan vitamin.

4. Cemaran mikrobial

Proses pengendalian terhadap cemaran mikrobial sangat penting untuk mencegah terhambatnya proses fermentasi. Salah satu cara untuk mencegah cemaran mikrobial adalah dengan pemanasan baik dengan sterilisasi maupun pasteurisasi.

5. Waktu

Waktu fermentasi mempengaruhi produk akhir yang dihasilkan. Sebagai contoh pada fermentasi asam laktat yang terlalu singkat dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri tidak optimal dan jumlah populasinya kurang untuk disebut probiotik. Sebaliknya, waktu fermentasi yang terlalu lama dapat menyebabkan timbulnya rasa asam yang berlebihan bahkan muncul rasa-rasa yang tidak diinginkan.

6. Mikroba

Fermentasi membutuhkan mikroba sebagai pemeran utama. Pemilihan mikroba yang tepat penting dilakukan untuk efisiensi proses fermentasi sehingga menghasilkan produk yang diinginkan. Sebagai contoh fermentasi alkohol umumnya menggunakan *Saccharomyces cerevisiae*, fermentasi yogurt menggunakan bakteri asam laktat.

7. Oksigen

Pada umumnya proses fermentasi alkoholik berlangsung pada kondisi anaerob (tanpa oksigen). Namun demikian, terdapat jenis mikrobial tertentu yang dapat berkembang dalam kondisi aerob (dengan oksigen) maupun anaerob, seperti khamir *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4. Karakteristik Nata

Nata merupakan produk makanan pencuci mulut yang kaya akan serat. Struktur nata menyerupai gel yang terbentuk di permukaan media yang mengandung gula dan asam dari hasil fermentasi bakteri *Acetobacter xylinum*. Zat yang melayang dalam media tersebut adalah polisakarida berupa selulosa. Gas CO₂ yang dihasilkan dari metabolisme glukosa oleh *Acetobacter xylinum* akan menempel pada fibril-fibril polisakarida sehingga menyebabkan zat tersebut mengapung (Majesty, 2015). Menurut SNI (Standar Nasional Indonesia) tahun 1996, karakteristik nata yang baik meliputi rasa, tekstur, warna, aroma, dan kandungan seratnya (Tabel 2).

Nata umumnya berwarna putih, kenyal, dan transparan seperti gel. Proses pembuatannya menggunakan media seperti air nanas, ampas tahu, dan air kelapa yang difermentasi secara aerob dengan bantuan mikroorganisme. Penamaan nata biasanya berdasarkan bahan baku yang digunakan, misalnya *nata de pine* dari nanas, *nata de coco* dari air kelapa, *nata de tomato* dari tomat, dan *nata de aloe* dari lidah buaya (Hamad, 2017). Kualitas nata ditentukan dari kandungan gizinya, seperti karbohidrat, protein, lemak, air, dan serat.

Serat nata terdiri dari selulosa, polimer alami dari glukosa yang saling terikat dengan ikatan 1,4- β -glikosida. Selulosa memiliki kekuatan fisik tinggi karena tersusun dari fibril-fibril yang kuat. Nata merupakan makanan rendah kalori yang dapat membantu memperlancar sistem pencernaan (Ernawati, 2012).

Ketentuan nata yang berkualitas berdasarkan SNI dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2. Syarat mutu nata kemasan SNI 01-4317-1996

No	Jenis Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	Normal
1.2	Rasaa	-	Normal
1.3	Warna	-	Normal
1.4	Tekstur	-	Normal
2	Bahan asing	-	Tidak boleh ada
3	Bobot tuntas	%	Min. 50
4	Jumlah gula (dihitung sebagai sukrosa)	%	Min. 15
5	Serat makanan	%	Maks. 4,5

6	Bahan tambahan makanan		
6.1	Pemanis buatan		
	- Sakarin		Tidak boleh
	- Siklambat		Tidak boleh
	- Pewarna tambahan		Sesuai SNI 01-02220-1995
6.2	Pengawet (Na Benzoat)		Sesuai SNI 01-02220-1995
6.3	Cemaran logam		
7	Timbal (Pb)		Maks. 0,2
7.1	Tembaga (Cu)	Mg/Kg	Maks. 2
7.2	Seng (Zn)	Mg/Kg	Maks. 5,0
7.3	Timah (Sb)	Mg/Kg	Maks. 40,0/259,0
7.4	Cemaran Asam (As)	Mg/Kg	Maks. 0,1
8	Cemaran mikroba	Mg/Kg	
9	Asam lempeng total		
9.1	Coliform	Koloni/g	Maks. 2,0 x 10 ⁵
9.2	Kapang	AMP/G	< 3
9.3	Khamir	Koloni/g	Maks. 50
9.4		Koloni/g	Maks. 50

2.5. Fermentasi Nata De Kakao

Menurut Andrade dkk. (2020) dan Sari (2022), fermentasi pulpa kakao menggunakan starter simbiosis bakteri-khamir (SCOBY) menghasilkan kombucha ekstrak pulpa kakao dengan karakteristik baik. Menurut Villarreal-Soto dkk. (2018) dan Nurhayati dkk. (2020) kombucha adalah salah satu minuman hasil fermentasi menggunakan starter mikroba kombucha yang disebut SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). SCOBY merupakan simbiosis dari kultur bakteri asam asetat (*Komagataebacter*, *Glucanobacter*, *Acetobacter*), bakteri asam laktat (*Lactobacillus*, *Lactococcus*), dan khamir (*Saccharomyces Cerevisiae*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Saccharomyces pombe*, *kloeckera apiculata*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis*, dan *Torulasporea delbrueckii*). *Saccharomyces cerevisiae* akan memecah gula membentuk alkohol, sedangkan *Acetobacter xylinum* mampu mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat

Proses fermentasi yang diawali oleh pemecahan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa oleh aktivitas khamir (*Saccharomyces cerevisiae*). Selanjutnya glukosa

diubah menjadi alkohol dan CO₂ yang bereaksi dengan air membentuk asam karbonat. Alkohol yang terbentuk akan dioksidasi oleh *Acetobacter* sebagai bakteri utama dalam kultur menjadi asetaldehid lalu menjadi asam asetat. Pada aktivitas biokimia yang kedua dari *Acetobacter* adalah pembentukan asam glukonat dari glukosa. Aktivitas lain dari *Acetobacter* (khususnya *Acetobacter xylinum*) adalah mengubah glukosa menjadi selulosa yang selanjutnya akan menjadi massa sel berupa nata atau umumnya disebut SCOBY yang bisa dipindahkan ke media baru sebagai starter. Dalam hal ini kombucha ekstrak pulpa kakao akan menghasilkan massa sel yang disebut nata de kakao.

Lapisan nata terbentuk melalui proses fermentasi oleh *Acetobacter xylinum*, yang memanfaatkan glukosa dari larutan gula. Di dalam sel bakteri, glukosa dikonversi menjadi UDP-glukosa sebagai prekursor, yang kemudian dipolimerisasi oleh enzim selulosa sintase menjadi rantai selulosa. Rantai selulosa ini diekstrusi ke luar sel dan membentuk fibril-fibril tipis. Fibril-fibril tersebut akan saling berikatan membentuk jaringan tiga dimensi, yang terus menebal seiring waktu hingga membentuk lapisan nata (Ross dkk., 1991). Saat metabolisme bakteri *Acetobacter xylinum* yang menempel pada permukaan polisakarida mengeluarkan gas karbon dioksida, yang menyebabkan lapisan tipis mengapung (Suratmiyati dkk., 2016). Lapisan tipis yang mengapung dari waktu ke waktu akan menebal dan membentuk nata.

Penelitian Widyaningrum dkk. (2017), menyatakan bahwa kandungan kimia nata de kakao menghasilkan karbohidrat 10,98 % dan serat 13,00 %. Kandungan gula dalam pulpa sekitar 10 - 15% dan kulit buah kakao yang cukup tinggi dapat dimanfaatkan oleh bakteri *Acetobacter xylinum* sebagai media tumbuh dan dikonversi menjadi produk makanan yaitu nata de kakao. Kualitas nata yang terbaik ditentukan oleh aktivitas *Acetobacter xylinum* yang membentuk selulosa berbentuk seperti benang-benang, akan bereaksi dengan polisakarida sehingga terbentuk jaringan tipis yang akan terus menebal menjadi nata.

Kondisi lingkungan dan gizi sebagai sumber karbon yang ideal akan mendukung aktivitas *Acetobacter xylinum* untuk membentuk nata de kakao yang terbaik. Salah satu faktor lingkungan adalah pH dan nutrisi (gula) sebagai sumber

karbon. Berdasarkan hal ini untuk mendapatkan hasil nata terbaik maka dibutuhkan kondisi lingkungan yang ideal berkaitan dengan pH media fermentasi nata de kakao yaitu pulpa kakao yang perlu dilakukan pengenceran untuk mendapatkan pH yang ideal, pH berkisar antara 4.0-5.0 dan dibutuhkan ketersediaan gula sederhana (glukosa, fruktosa dan sukrosa) dan tersedianya unsur nitrogen (N) yang berpengaruh terhadap karakteristik nata yang dihasilkan dan pembentukan nata dapat dipengaruhi oleh lama fermentasi (Keshk dkk., 2006).

2.6. Mikroorganisme Pada Starter SCOBY

Mikroorganisme pada starter SCOBY yang berperan dalam proses fermentasi yaitu golongan khamir, fungi, dan bakteri yang bekerja secara simbiotik. Mikroorganisme SCOBY dalam kultur kombucha bekerja dengan mengkonversi teh manis ke berbagai macam jenis asam, vitamin, dan molekul kompleks serta mikronutrisi. Molekul kompleks ini bertanggung jawab dalam memberikan manfaat yang berkhasiat bagi kesehatan. Komponen yang dihasilkan saat fermentasi antara lain etanol, asam asetat dan asam glukonat, asam fenolat, asam laktat, vitamin B dan enzim (Azizah dkk., 2020). Mikroorganisme pada SCOBY yaitu bakteri asam asetat (*Acetobacter*), bakteri asam laktat (*Lactobacillus* dan *Pediococcus*), khamir (*Saccharomyces*), dan mikroorganisme lainnya (*Brettanomyces*, *Gluconacetobacter Kombuchae*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*) (Khamidah dan Antarlina, 2020).

1. Bakteri *Acetobacter*

Bakteri asam asetat pada SCOBY adalah Bakteri *Acetobacter*. Strain bakteri *Acetobacter* bersifat aerobik menghasilkan asam asetat dan asam glukonat. Jenis *Acetobacter* yang umum ditemukan dalam strain kombucha antara lain *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinodes*, dan *Acetobacter ketogenum*. *Acetobacter*. Bakteri *Acetobacter xylinum* merupakan bakteri pembentuk selulosa dengan memanfaatkan gula sukrosa dalam media fermentasi sebagai sumber energi. Selain itu, *Acetobacter xylinum* untuk tumbuh dan berkembang membutuhkan kandungan air, protein, lemak, mineral dan vitamin. Kandungan mineral dalam substrat akan membantu meningkatkan aktivitas enzim kinase

dalam metabolisme sel *Acetobacter xylinum* untuk menghasilkan selulosa (Misgiyarta, 2007).

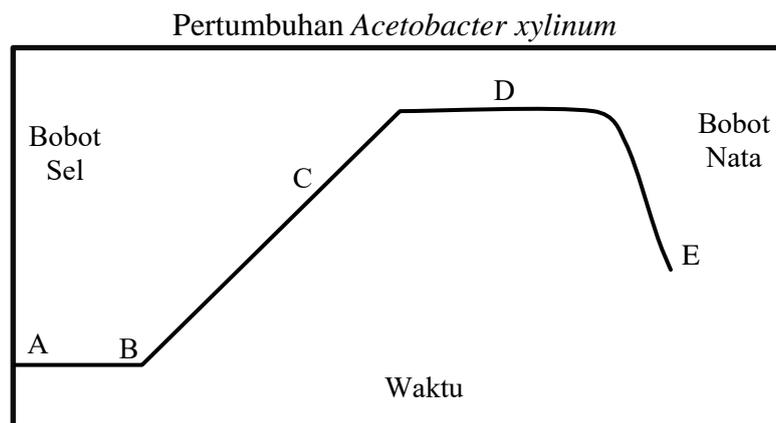
Acetobacter xylinum merupakan bakteri gram negatif karena mengandung substansi lipid yang lebih tinggi serta dinding selnya lebih tipis, lebih rentan pada antibiotik, penghambatan warna basa kurang dihambat, pertumbuhan nutriennya relatif sederhana dan tahan terhadap perlakuan fisik. *Acetobacter xylinum* salah satu bakteri autotrof karena sumber nutriennya mengandung unsur C, H, O, dan N sebagai penyusun protoplasma, sumber energi untuk pertumbuhannya memerlukan cahaya, sumber karbon untuk pertumbuhannya membutuhkan CO₂. *Acetobacter xylinum* bersifat non motil atau polar ialah bakteri yang tidak bergerak, tidak bereproduksi dengan tunas (*budding*) tidak membentuk endospora (spora yang berdinding tebal di dalam bakteri).

Acetobacter xylinum bakteri mikroaerofilik artinya bakteri ini dapat tumbuh baik bila ada sedikit oksigen atmosferik, kelompok bakteri asam asetat melalui proses oksidasi metal alkohol dapat menghasilkan asam asetat. *Acetobacter xylinum* termasuk bakteri mesofil yaitu tumbuh pada suhu 25°C-40°C (Kazumi, 2012).

Acetobacter xylinum dapat membentuk asam dari glukosa, etil alkohol, dan propil alkohol, tidak membentuk indol dan mempunyai kemampuan mengoksidasi asam asetat menjadi CO₂ dan H₂O. Sifat yang paling menonjol dari bakteri ini adalah memiliki kemampuan mempolimerisasi glukosa hingga menjadi selulosa. Selanjutnya, selulosa tersebut membentuk matrik yang dikenal sebagai nata. Faktor-faktor dominan yang mempengaruhi sifat fisiologi dalam pembentukan nata adalah ketersediaan nutrisi, derajat keasaman, temperatur, dan ketersediaan oksigen (Rasyidah, 2020).

Fase-fase pertumbuhan *Acetobacter xylinum* yaitu fase adaptasi, fase pertumbuhan awal, fase pertumbuhan eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Fase adaptasi *Acetobacter xylinum* berkisar antara 0-24 jam sejak inokulasi. Pada fase ini *Acetobacter xylinum* memulai metabolisme seluler dan sel bakteri bertambah besar tetapi belum bereplikasi sehingga belum ada peningkatan jumlah sel. Fase pertumbuhan awal dimulai dengan pembelahan

kecepatan rendah. Fase pertumbuhan eksponensial dicapai *Acetobacter xylinum* tumbuh dengan cepat dalam waktu 3-13 hari dengan medium pertumbuhan dikonsumsi pada tingkat maksimal sehingga terjadi sintesis enzim ekstraseluler polimerasi yang cukup banyak untuk menyusun polimer glukosa menjadi selulosa. Fase stasioner umumnya terjadi pada hari 13-16 dengan menurunnya pertumbuhan *Acetobacter xylinum* karena ketersediaan nutrisi mulai berkurang, selain itu terdapat pengaruh metabolit toksik dari metabolisme sel dan umur sel yang semakin tua. Fase kematian . *Acetobacter xylinum* terjadi mulai hari ke 16 dan seterusnya. Kecepatan kematian bakteri dipengaruhi oleh nutrisi dan lingkungan, akibat nutrisi yang semakin habis dan akumulasi limbah metabolit toksik yang semakin bertambah membuat lingkungan tidak cocok untuk pertumbuhan bakteri . Fase pertumbuhan *Acetobacter xylinum* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Fase-fase pertumbuhan bakteri *Acetobacter xylinum* (Melviani dkk, 2014)

2. *Saccharomyces*

Saccharomyces adalah genus yeast utama yang berperan dalam fermentasi kombucha dengan mengubah gula menjadi alkohol dan karbon dioksida. Strain seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, dan *S. apiculatus* paling sering ditemukan dalam kombucha. Selain itu, yeast lain seperti *Schizosaccharomyces pombe* dan *Zygosaccharomyces* juga berkontribusi pada proses fermentasi. Kombinasi berbagai yeast ini menghasilkan rasa, aroma, dan kandungan alkohol

khas kombucha. *Saccharomyces* membantu menjaga fermentasi tetap stabil dan memengaruhi profil metabolit, sehingga menciptakan karakter unik pada minuman ini.

3. BAL

Bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus* merupakan mikroorganisme anaerobik yang banyak ditemukan dalam kombucha dan berperan penting dalam proses fermentasi. *Lactobacillus* menghasilkan asam laktat dan lendir, yang berkontribusi pada penurunan pH serta rasa asam khas kombucha. Selain itu, bakteri *Pediococcus* juga bersifat anaerob dan menghasilkan asam laktat serta lendir selama fermentasi. Kehadiran BAL ini tidak hanya memberikan cita rasa asam, tetapi juga berfungsi sebagai probiotik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella typhi*. Aktivitas fermentasi BAL menyebabkan penurunan pH kombucha yang membantu menjaga kestabilan mikrobiologis dan meningkatkan sifat antimikroba serta antioksidan dari minuman ini. Kombinasi BAL dengan bakteri asam asetat dan yeast dalam SCOBY menciptakan simbiosis yang menghasilkan berbagai asam organik, vitamin, dan senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan.

4. Mikroba lainnya

Selain *Saccharomyces* dan bakteri asam laktat, mikroba lain yang berperan penting dalam fermentasi kombucha meliputi beberapa strain yeast dan bakteri spesifik. *Brettanomyces*, terutama *Brettanomyces bruxellensis* dan *Brettanomyces intermedius*, dapat bersifat aerobik atau anaerobik dan berfungsi menghasilkan alkohol maupun asam asetat, sehingga memberikan kontribusi pada rasa dan aroma khas kombucha. *Gluconacetobacter kombuchae* adalah bakteri aerobik yang memanfaatkan nitrogen dan menghasilkan asam asetat serta asam glukonat, yang berperan dalam pembentukan asam organik dan kestabilan fermentasi. Selain itu, strain yeast *Zygosaccharomyces kombuchaensis* mampu menghasilkan alkohol dan karbonasi, serta berkontribusi dalam pembentukan nata de ocha, yaitu lapisan selulosa yang mengapung di permukaan fermentasi kombucha. Kombinasi mikroba ini bersama *Saccharomyces* dan bakteri asam

laktat menciptakan simbiosis yang menghasilkan berbagai senyawa bioaktif seperti etanol, asam asetat, asam glukoronat, vitamin, dan enzim, yang memberikan nilai fungsional dan cita rasa unik pada kombucha

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Kimia Biokimia Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, dan Analisis Sensori Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2024 - Agustus 2024.

3.2. Bahan dan Alat

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, H₂SO₄ 1,25%, NaCl 0,85%, alkohol 96% (Medika), fenol 5% dan sukrosa.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu spektrofotometer, sentrifuge, colorimeter, timbangan analitik, jangka sorong, toples kaca, sendok, panci, kompor gas, kompor listrik, karet gelang, baskom plastik, gunting, aluminium foil, kapas, tisu, spatula, batang pengaduk, saringan, pH meter (HANA), cawan porselin, tabung reaksi, gelas beaker, erlenmeyer, labu ukur, kertas saring, spritus, pipet ukur, *autoclave*, vortex, bunsen, pipet volume, oven dan termometer.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian 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 10°brix (G₁), 12°brix (G₂), 14°brix (G₃), 16°brix (G₄), 18°brix (G₅). Faktor kedua lama fermentasi (F) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 0 hari (F₀), 7hari (F₇), dan 14 hari (F₁₄). Pada penelitian ini terdapat lima belas kombinasi perlakuan yang akan dicoba yaitu (G₁F₀), (G₂F₀), (G₃F₀), (G₄F₀), (G₅F₀), (G₁F₇), (G₂F₇), (G₃F₇), (G₄F₇), (G₅F₇), (G₁F₁₄), (G₂F₁₄), (G₃F₁₄), (G₄F₁₄), (G₅F₁₄). Tata letak perlakuan penambahan gula dan lama fermentasi disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Tata letak kombinasi perlakuan penambahan gula dan lama fermentasi

Ulangan		
I	II	III
G ₃ F ₇	G ₄ F ₁₄	G ₁ F ₀
G ₁ F ₁₄	G ₅ F ₀	G ₅ F ₇
G ₅ F ₀	G ₂ F ₇	G ₁ F ₁₄
G ₂ F ₁₄	G ₂ F ₀	G ₂ F ₇
G ₁ F ₀	G ₁ F ₁₄	G ₃ F ₁₄
G ₄ F ₁₄	G ₃ F ₇	G ₅ F ₀
G ₄ F ₇	G ₃ F ₁₄	G ₁ F ₇
G ₅ F ₇	G ₄ F ₀	G ₂ F ₁₄
G ₃ F ₁₄	G ₅ F ₇	G ₂ F ₀
G ₄ F ₀	G ₂ F ₁₄	G ₄ F ₇
G ₁ F ₇	G ₁ F ₇	G ₅ F ₁₄
G ₂ F ₀	G ₃ F ₀	G ₄ F ₀
G ₅ F ₁₄	G ₅ F ₁₄	G ₃ F ₇
G ₂ F ₇	G ₁ F ₀	G ₄ F ₁₄
G ₃ F ₀	G ₄ F ₇	G ₃ F ₀

Keterangan:

G₁F₀ = Gula 10°brix fermentasi 0 hari

G₂F₀ = Gula 12°brix fermentasi 0 hari

G₃F₀ = Gula 14°brix fermentasi 0 hari

G₄F₀ = Gula 16°brix fermentasi 0 hari

G₅F₀ = Gula 18°brix fermentasi 0 hari

G₁F₇ = Gula 10°brix fermentasi 7 hari

G₂F₇ = Gula 12°brix fermentasi 7 hari

G₃F₇ = Gula 14°brix fermentasi 7 hari

G₄F₇ = Gula 16°brix fermentasi 7 hari

G₅F₇ = Gula 18°brix fermentasi 7 hari

G₁F₁₄ = Gula 10°brix fermentasi 14 hari

G₂F₁₄ = Gula 12°brix fermentasi 14 hari

G₃F₁₄ = Gula 14°brix fermentasi 14 hari

G₄F₁₄ = Gula 16°brix fermentasi 14 hari

G₅F₁₄ = Gula 18°brix fermentasi 14 hari

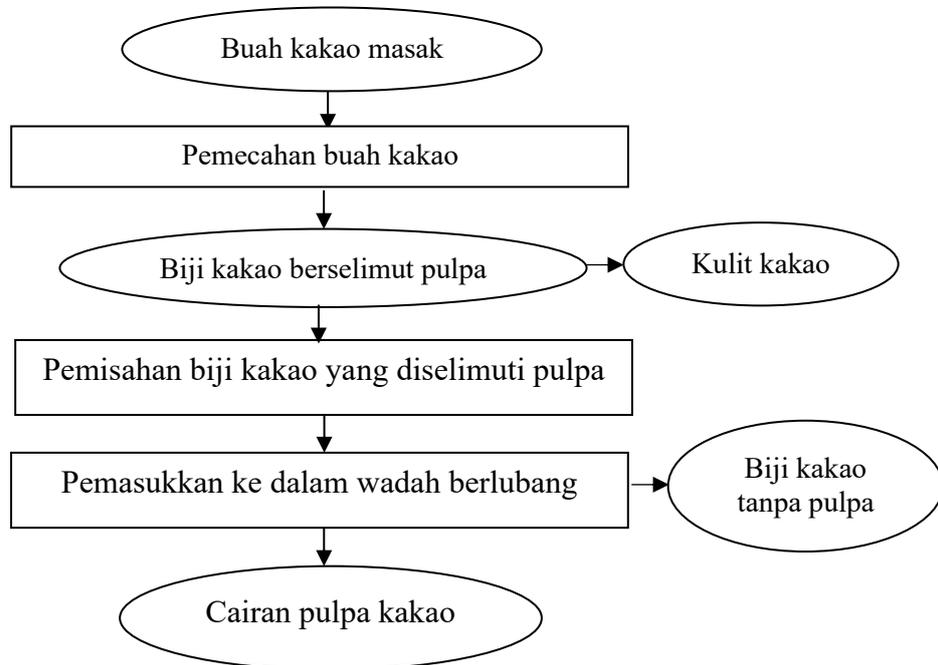
Pengamatan yang dilakukan meliputi pH media fermentasi, total gula media fermentasi, rendemen, ketebalan, kadar air, indeks keputihan nilai L*(Lightness), uji sensori hedonik, penentuan perlakuan terbaik dan uji SEM nata de kakao. Data yang diperoleh diuji kehomogennannya dengan uji *Bartlett* dan dilakukan uji *Tuckey*. Data kemudian di analisis dengan sidik ragam 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 5.



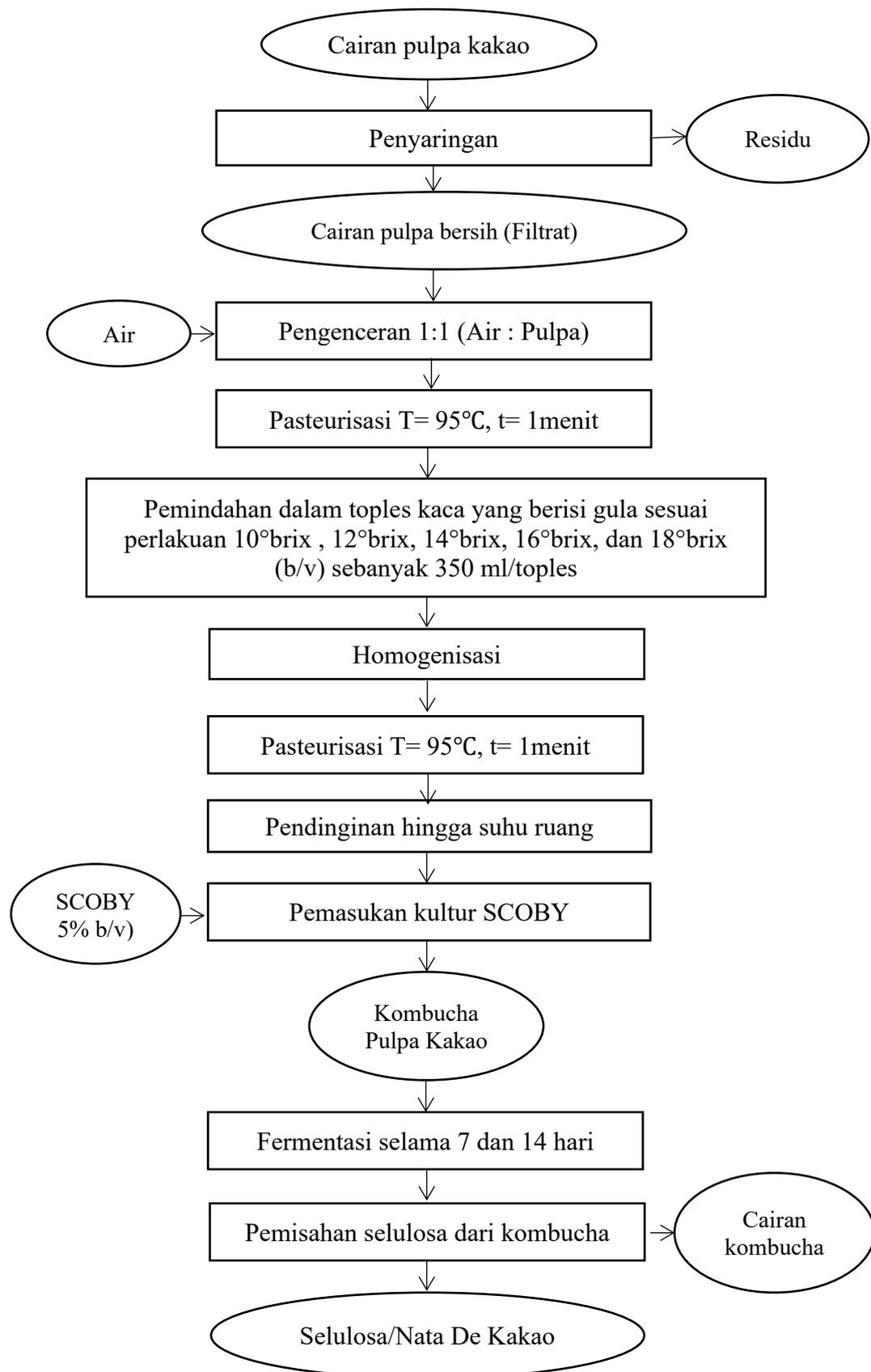
Gambar 5. Diagram alir penyiapan pulpa kakao sebagai bahan baku media
Sumber: Yuliana dkk. (2022)

3.4.2. Persiapan

Tahap persiapan yang dilakukan yaitu menyiapkan semua alat dan bahan serta mensterilkan alat. Alat yang disterilisasi dalam pembuatan nata de kakao adalah toples kaca, dengan cara merendam toples ke dalam air mendidih selama 10 menit. Hal ini berfungsi untuk menjaga alat yang digunakan tetap steril agar proses fermentasi menjadi lebih optimal.

3.4.3. Pembuatan Nata De Kakao

Proses pembuatan media fermentasi nata de 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, cairan pulpa kakao diencerkan dengan penambahan air menggunakan perbandingan 1:1, masing-masing sebanyak 2 L, setelah diencerkan larutan pulpa kakao dipasteurisasi pada suhu 93°C selama 1 menit. Larutan pulpa yang sudah dipasteurisasi dipindahkan ke dalam erlenmeyer yang berisi gula pasir (sukrosa) yang telah ditimbang dan disteril sebelumnya lalu didinginkan hingga suhu ruang. Gula yang ditambah telah ditimbang sebelumnya untuk mencukupi perlakuan 10°brix , 12°brix , 14°brix , 16°brix , dan 18°brix (b/v). Kemudian larutan pulpa kakao dipindahkan ke dalam toples kaca steril, yang masing-masing berisi larutan pulpa sebanyak 350 ml dan ditambahkan dengan kultur SCOBY sebanyak 10°brix (b/v). Setelah itu, toples ditutup dengan tisu dapur dan diikat karet. Larutan pulpa kakao difermentasi selama 7 dan 14 hari pada suhu kamar. Pada saat pengamatan hari ke 7 dan 14, nata de kakao (selulosa) dipisahkan dari cairan media fermentasi, ditiriskan dan diuji karakteristiknya. Diagram alir fermentasi nata de kakao dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram alir pembuatan Nata De Kakao
 Sumber: Yuliana dkk (2019), telah dimodifikasi

3.5. Pengamatan

3.5.1. Pengujian Total Gula Media Fermentasi (Dubois dkk., 1956)

Pengujian total gula menggunakan metode fenol-sulfat. Langkah pertama yaitu mempersiapkan sampel terlebih dahulu yang dicentrifuge (10000 rpm) dan dilakukan pengenceran (1 ml sampel : 9 ml aquades) dan pembuatan larutan blanko. Setelah itu membuat larutan fenol 5% dengan cara melarutkan fenol 50 g dilarutkan dalam satu liter aquades. Kemudian membuat kurva standar yang dilakukan dengan cara membuat larutan induk glukosa dengan melarutkan 100 mg glukosa dalam 100 ml aquades. Pembuatan larutan standar glukosa dengan cara mengencerkan 10 ml larutan induk glukosa dengan aquades sampai volume 100 ml.

Larutan standar glukosa diambil sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 dan 1 ml, kemudian masing-masing diencerkan dengan aquades sampai dengan volume 1 ml. Lalu sebanyak 0,5 ml larutan diambil dari setiap konsentrasi larutan standar glukosa tersebut dan ditambahkan 0,5 ml larutan fenol 5% dalam tabung reaksi. Larutan kemudian divortex dan ditambahkan 2,5 ml larutan asam sulfat pekat dengan cepat secara tegak lurus ke permukaan cairan. Lalu larutan didiamkan selama 10 menit, divortex selama 30 detik, dan ditempatkan dalam *water bath* yang berisi air hangat selama 15-20 menit sehingga terbentuk warna *orange-yellow* yang stabil. Setelah itu absorbansinya diukur pada 490 nm dengan spektrofotometer. Analisis pada sampel dilakukan dengan memasukkan 0,5 ml sampel ke dalam tabung reaksi dan dilakukan tahap seperti pada pembuatan kurva standar. Perhitungan konsentrasi gula dalam sampel ditentukan dengan menggunakan kurva standar dan memperhitungkan pengenceran yang dilakukan. Persamaan regresi kurva standar yang digunakan pada penelitian ini sebagai berikut:

$$y=0,8675x+0,2041 \text{ maka, } x=(y-0,2041)/0,8675$$

kemudian nilai x dibagi dengan faktor pengenceran sehingga didapatkan konsentrasi gula (g/ml) kemudian dikonversi menjadi persentase (%)
Y= Regresi persamaan kurva standar , X= nilai a*bsorbansi

3.5.2. Pengukuran pH Media Fermentasi

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, yang telah dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan pH 7.01 dan pH 4.01. Sebelum digunakan, elektroda pH meter dibilas terlebih dahulu dengan aquades lalu dikeringkan dengan kain flanel. Pertama sampel minuman dituang ke dalam gelas beaker sebanyak 30 ml, lalu pH meter dicelupkan ke dalam sampel, dan ditunggu sampai angka pada layar pH meter stabil.

3.5.3. Ketebalan Nata De Kakao

Pengukuran ketebalan menggunakan metode Novita dkk. (2016), dengan menggunakan jangka sorong. Nata de kakao ditiriskan selama 10 menit, kemudian nata de kakao diukur pada masing-masing sisi dengan menggunakan jangka sorong. Selanjutnya, rata-rata hasil pengukuran dihitung.

3.5.4. Rendemen Nata De Kakao

Analisis rendemen menggunakan metode AOAC (2016), yaitu nata yang dihasilkan ditimbang beratnya dan dibagi dengan berat medium lalu dikali 100%. Perhitungan rendemen nata menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat nata}}{\text{Berat medium}} \times 100\%$$

3.5.5. Kadar Air Nata De Kakao

Analisis kadar air menggunakan metode *gravimetri* AOAC (2016). Cawan dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit, lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit, kemudian ditimbang dan dicatat bobot kosongnya (A).

Selanjutnya 4 g nata de kakao dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya, lalu ditimbang (B). Cawan berisi sampel dikeringkan di dalam oven

pada suhu 105°C selama 6 jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang serta dicatat beratnya. Proses tersebut dilakukan secara terus menerus sampai berat cawan konstan (C). Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B - C}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan :

A = berat cawan kosong (g)

B = berat cawan + sampel awal (g)

C = berat cawan + sampel kering (g)

3.5.6. Indeks Warna dan Indeks Keputihan

Warna nata de kakao dievaluasi menggunakan colorimeter (Model WR 10), yang memungkinkan pengukuran nilai L, a, dan b yang tepat. Nilai L menunjukkan kecerahan, dengan 100 mewakili putih dan 0 mewakili hitam. Nilai a* mewakili kemerahan (-a) atau kehijauan (+a), sedangkan nilai b* menunjukkan kekuningan (+b) atau kebiruan (-b). Sampel nata de kakao diletakkan di wadah dalam keadaan tertutup kain agar tidak bias dengan cahaya luar kemudian di letakkan alat colorimeter di atas sampel ditekan tombol pendeteksi nilai L,a,b. Perhitungan indeks keputihan nata menggunakan metode indeks keputihan ASTM E313 yaitu $WI = L^* - 3b^*$. Semakin tinggi nilai WI maka sampel semakin putih. Nilai WI yang dibawah 80 umumnya menunjukkan sampel masih memiliki warna selain putih (misal kekuningan atau keabu-abuan).

$$WI = L^* - 3b^*$$

3.5.7. Pengujian Sensori Hedonik

Pengujian sensori dilakukan setelah persiapan produk nata de kakao. Nata (selulosa) yang dihasilkan fermentasi kombucha pulpa kakao dicuci dan dibuang

sisasisa media yang masih menempel. Nata kemudian dicuci kembali secara berulang sebanyak lima kali dengan air mengalir. Setelah itu, nata direndam ke dalam air selama 24 jam kemudian dicuci kembali dengan air mengalir. Selanjutnya nata direbus ke dalam air gula dengan perbandingan gula dan air 1:5. Kemudian, nata disajikan menggunakan wadah cup yang berisi larutan air gula. Nata de kakao telah siap untuk dilakukan pengujian.

Uji sensori dilakukan terhadap nata de kakao yaitu uji hedonik yang meliputi rasa, aroma, warna, dan penerimaan secara keseluruhan. Uji hedonik merupakan pengujian yang paling banyak digunakan untuk mengukur tingkat kesukaan terhadap produk dengan skala hedonik: amat sangat suka, sangat suka, suka, agak suka, dan tidak suka (Permadi dkk., 2019). Uji hedonik dilakukan oleh panelis yang terdiri dari mahasiswa jurusan THP, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Panelis diminta untuk memberikan pendapat kesukaan terhadap sampel pada form uji hedonik. kuisisioner uji hedonik terdiri dari tujuh skala penilaian pada tiap atribut sensori yaitu (1) sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) agak suka, (4) netral, dan (5) agak suka, (6). suka, dan (7). sangat suka. Kuisisioner uji hedonik disajikan pada Tabel 4. Sampel yang diberikan pada panelis diletakkan dalam cup bening dan diberi kode acak.

3.5.8. Penentuan Perlakuan Terbaik

Penentuan perlakuan terbaik dianalisis menggunakan metode indeks efektivitas (DeGarmo dkk., 1984), dengan cara pemberian bobot pada masing-masing parameter berdasarkan kepentingan (Tabel 5). Formulasi terbaik didapatkan berdasarkan nilai produk tertinggi. Rumus-rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Bobot Nilai (BN)} = \frac{\text{Bobot Perlakuan}}{\text{Total Bobot Perlakuan}}$$

$$\text{Nilai Efektivitas (NE)} = \frac{\text{Bobot Perlakuan} \times \text{Nilai Perlakuan} - \text{Nilai Terendah}}{\text{Nilai Tertinggi} - \text{Nilai Terendah}}$$

$$\text{NP} = \text{BN} \times \text{NE}$$

Keterangan:

BN = Bobot Nilai

NE= Nilai Efektivitas

NP= Nilai Produk

Tabel 5. Bobot penentuan perlakuan terbaik

No	Parameter	Bobot
1	Tekstur	0,20
2	Warna	0,18
3	Aroma	0,16
4	Rasa	0,13
5	Penerimaan keseluruhan	0,11
6	Ketebalan	0,09
7	Rendemen	0,07
8	Indeks warna	0,04
9	Kadar air	0,02

3.8.9. Uji Scanning Electron Microscope (SEM)

Perlakuan terbaik diuji scanning electron microscope . Pengujian dilakukan menggunakan instrument SEM ZEISS MA 10. Sebelum dilakukan pengujian sampel dilapisi dengan bahan logam emas menggunakan alat quorum. Selanjutnya sampel yang diuji dilakukan pengamatan morfologi.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah :

1. Semakin tinggi konsentrasi gula (G1, G2, G3, G4, dan G5) maka semakin meningkat ketebalan, rendemen nata de kakao dan total gula pada media fermentasi nata de kakao, sedangkan kadar air, indeks keputihan nata de kakao, dan pH pada media semakin menurun.
2. Semakin lama fermentasi 7 dan 14 hari meningkatkan ketebalan dan rendemen nata de kakao sedangkan indeks warna, kadar air nata de kakao, total gula dan pH media fermentasi nata de kakao semakin menurun.
3. Kombinasi penambahan gula dan lama fermentasi menghasilkan karakteristik nata de kakao terbaik pada perlakuan G5F7 (konsentrasi gula 18°brix fermentasi 7 hari) dengan nilai ketebalan 2,80 mm; rendemen 8,330 gr; indeks keputihan 51,370; kadar air 93,009; sensori hedonik tekstur 5,178 (kenyal), warna 5,356 (putih); aroma 4,772 (nata); rasa 5,222 (manis), dan penerimaan keseluruhan (5,211) agak suka.

5.2. Saran

Saran yang diajukan untuk penelitian ini yaitu:

1. Penelitian menggunakan berbagai jenis sumber gula yang lainya seperti gula semut, madu, atau gula tebu halus sebagai sumber nutrisi.
2. Penelitian perbaikan kualitas produk nata de kakao sehingga disukai konsumen.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustin, F. dan W. D. R. Putri. 2014. Pembuatan jelly drink *Averrhoa blimbi* L. (Kajian Proporsi Belimbing Wuluh: Air Dan Konsentrasi Karagenan). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3): 1-9.
- Alfarisi, C.D., Yelmida., Zahrina, I., dan Mutamima, A. 2021. Pembuatan nata de cassava dari limbah cair tapioka dengan menggunakan sumber nitrogen alami yang berbeda. *Jurnal ilmiah pertanian*. 17 (2) : 93-100.
- Andrade, A.B.D., Souza, C.C.A.D., Grimaut, D.A., Porto, E.A., Silva, G.D.S., Silva, J.S.D.J., Bastos, L.C., Silva, R, N.A.D., Anunciacao, T.A.D., Soarws S.E. and Magalhaes-Guedes, K.T. 2020. Kombucha-based cocoa honey beverage. *World Applied Sciences Journal*. 38 (1) : 58-64.
- Anggraini, Ardhelia Christy., dan Retnaningrum, E. 2023. Efektivitas dan kualitas produk fermentasi kombucha dengan kombinasi substrat teh daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) dan lemon (*Citrus limon* L.) (*Burm. f.*). *Jurnal Pengolahan Pangan*. 8 (2):97-106.
- Afolabi, O., Ibitoye, F.A. 2015. Evaluation of nutritional and sensory properties of cocoa pulp beverage supplemented with pineapple juice. *Journal of Food Research*. 4 (6): 58.
- AOAC International. 2016. *Appendix F: Guideline for Standard Method Performance Requirement*. AOAC Official Method of Analysis. AOAC International, pp. 1-18.
- Azizah, A.N., Darma, G.C.E., dan Darusman, F. 2020. Formulasi SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) dari raw kombucha berdasarkan perbandingan media pertumbuhan larutan gula dan larutan teh gula. *Prosiding Farmasi*. 6 (2) : 325-331
- Dewayani, W., dan Syamsuri, R. 2019. Pengaruh faktor pengenceran pulp dan lama penyimpanan terhadap kualitas nata de kakao. *Jurnal Buletin Inovasi Pertanian*. 16 : 75-81.
- Dubois, M., Guilles, K.A., Hamilton, J.K., dkk. 1956. Calorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. (18) : 350 - 356.

- Effendi, S. 1995. Utilization of cacao sweatings for nata production using *Acetobacter xylinum*. *Menara Perkebunan*. 63(1): 23–26.
- Ernst, E. 2003. Kombucha: a systematic review of the clinical evidence. *forschende komplementarmedizin und klassische naturheilkunde. Research in Complementary and Natural Classical Medicine*. 10 (2) : 85-87.
- Fara, P., Illiya, N., Hardjono. 2019. Pengaruh Penambahan Nutrisi NPK dalam Pembuatan Bioetanol dari Kulit Pisang Kepok dengan Proses Fermentasi, *Jurnal Teknologi Separasi*, Vol. 5, No. 2, 184-188.
- Galung, F. S. 2001. Pengaruh penambahan gula terhadap pembentukan serat Nata de langsung (*Lansium domesticum*). *Jurnal Technology*. 1(2):1-5.
- Hasanah, A.N., Agung, S.F.A., Saptarini, N.M., Ramdhani, D., Ariyanti, A.D., Henry, N., Suherman, S.E., dan Karen, L.K. 2015. IBM pembuatan minuman kesehatan cuka coklat dari limbah pulp biji coklat. *Jurnal Unpad Farmaka*. 13 (4) : 10-15.
- Hasanela, N., Telussa, I., Kapelle, I.B.D., Sohilait, M.R., dan Rahayu, M.M.F. 2023. Pengolahan nata de coco sebagai produk potensial limbah air kelapa asal desa tial kecamatan salahutu. *ICSJ*. 1 (1) : 1-4
- Herawaty, N. Dan Moulina, M.A. 2015. Kajian variasi konsentrasi sukrosa terhadap karakteristik nata timun suri (*Cucumis sativus* L.). *AGRITEPA*. 2 (1): 89-104.
- Jamilah, V. 2019. Pengaruh Variasi Konsentrasi Starter terhadap Kualitas Teh Kombucha. UIN Raden Intan Lampung. Bandar Lampung
- Kamsina., Anova, T.I. dan Firdausni. 2015. Pengaruh perbandingan sari buah dan gula terhadap mutu minuman fungsional labu kuning. *Jurnal Litbang Industri*. 5 (2) : 113-122
- Khootama, A., Putri, D.N., dan Hermansyah, H. 2018. Techno-economic analysis of lipase enzyme production from *Aspergillus niger* using agro-industrial waste by solid state fermentation. *Energy Procedia*. 153 : 143–148.
- Kunaepah, U. 2008. Pengaruh Lama Fermentasi dan Konsentrasi Glukosa terhadap Aktivitas Bakteri, Polifenol Total dan Mutu Kimia Kefir Susu Kacang Merah. [Tesis]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Laureys, D., Britton, S. J., dan De Clippeleer, J. 2020. Kombucha tea fermentation: a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 78 (3): 165–174.
- Lestari, D., dan Fatimah, S. 2021. Pengaruh penambahan ekstrak kecambah dan kadar gula pasir terhadap karakteristik nata de soya dari limbah cair tahu. *Jurnal Ilmiah Teknik Sipil dan Teknik Kimia*. 6 (2): 112-119

- Lopez, A.Z. 1986. *Chemical Change Occurring During the Processing of Cacao, Proceeding of the Cacao Biotechnology symposium*. Department of Food Science Colege of Agriculuture, The Pennsylvania State University. Pennsylvania. USA.
- Miskah, S., Istiqomah, N., dan Malami, S. 2016. Pengaruh konsentrasu asam pada proses hidrolisis dan waktu fermentasi pembuatan bioetanol dari buah sukun (*Artocarpusaltilis*). *Jurnal Teknik Kimia*. 22 (3) : 45-57.
- Murugan, K. and Al-Sohaibani, S. 2012. *Valorization of Food Processing By-products*. CRC Press Taylor and Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW. 455- 488.
- Najri, M., Antara, N.S., dan Wijaya, I, M.M. 2022. Pengaruh penambahan gula dan lama fermentasi terhadap karakteristik selulosa bakterial dari kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca*. L.). *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 10 (2) : 211-220.
- 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.
- Ninda,F. S. 2022. *Sensori Kombucha Pulpa Kakao dan Pendugaan Harga Pokok Produksi: Efek Penambahan Jahe (Zingiber officinale)*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Nurdin, G.M., Nurhidayah, dan Aminah. 2023. Pengaruh konsentrasi starter *Acetobacter xylinum* dan lama fermentasi terhadap kualitas produk nata de coco. *Jurnal BIOMA*. 5 (2) : 116-125.
- Nurfaillah, Masri, sari, E.R., Herlinda, dan Patang. 2018. Pemanfaatan limbah pulp kakao menjadi nata de cacao. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. 4:24-33.
- Nurhayati, Asmawati, Ihromi, S., Marianah, dan Saputrayadi, A. 2020. Penyuluhan gizi dan pelatihan pengolahan produk berbasis jagung sebagai upaya meminimalisir stunting di Desa Labuapi Kabupaten Lombok Barat. *Jurnal Masyarakat Mandiri*. 4(5) : 8–10.
- Pawaskar, S, P., Pawar, C, D., Dhumal, R, D., Bhuvad, A, V., dan Kadam, J, J. 2020. Effect of different dilution and pH levels on chemical composition and fermentation of kokum must. *IJCMAS*. 11: 343-351.
- Purnami, K.I., Jambe, A.A.G.N.A., dan Wisaniyasa, N, W. 2018. Pengaruh jenis teh terhadap karakteristik teh kombucha. *Jurnal ITEPA*. 7(2).

- Puspaningrum, D.H.D., Sumadewi, N.L.U., dan Sari, N.K.Y. 2021. Kandungan total asam, total gula dan nilai pH kombucha cascara kopi arabika desa catur bangli selama fermentasi. *Prosiding SINTESA*. 4: 156.
- Putra, G.P.G. dan Wartini, N.M. 2014. Kajian kuantitas dan karakteristik cairan pulpa hasil samping fermentasi biji kakao menggunakan wadah sistem “termos” sebagai bahan baku asam asetat. *Jurnal Media Ilmiah Teknologi Pangan*. 1 (1) : 31-40.
- Putra, G.P.G., Wartini, N.M., dan Darmayanti, L.P.T. 2017. Kajian metode dan waktu fermentasi cairan pulpa pada perubahan karakteristik cuka kakao. *Jurnal AGRITECH UGM*. 37 (1):38-47.
- Putri, A.N. dan Fatimah, S. 2021. Karakteristik nata de soya dari limbah cair tahu dengan pengaruh penambahan ekstrak jeruk nipis dan gula. *IJCA*. 4 (2) : 47-57.
- Putri, S.N.Y., Syahrani, W.F., Utami, C.V.B., Safitri, D. R., Arum, Z.N., Prihastari, Z.S., dan Sari, A.R. 2021. Pengaruh mikroorganisme, bahan baku, dan waktu inkubasi pada karakter nata : review. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 14 (1) : 62-74.
- Putriana, I., dan Aminah, S. 2013. Mutu fisik, kadar serat dan sifat organoleptik nata de cassava berdasarkan lama fermentasi. *Jurnal Pangan dan Gizi*. 4 (7): 29-38.
- Rachmatullah, D., Desiana, N., Fiki, H., dan Noor, H. 2021. Karakteristik biji kakao (*Theobroma cacao* L.) hasil fermentasi dengan ukuran wadah berbeda. *Jurnal Variabel Pertanian*. 5 (1).
- Rachmawati, N.A., Haryati, S., dan Munandar, A. 2017. Karakteristik nata de sea weed dengan konsentrasi bakteri *Acetobacter xylinum*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 7(2):112-124.
- Rahayu, E. S., dan Kuswanto, K.R. 1987. *Teknologi Pengolahan Minuman Beralkohol*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Rahmawasih. 2016. Efektivitas limbah pulp kakao (*Theobroma cacao* L.) sebagai herbisida gulma rumput teki (*Cyperus kyllingia*). *Jurnal Pertanian Berkelanjutan*. 4 (1) : 1-10.
- Ramadhan, B.R., Rangkuti, M.E., Safitri, S.I., Apriani, V., Raharjo, A.S., Titisgati, Ednita Androgini., dan Afifah, Diana Nur. 2019. Pengaruh penggunaan jenis sumber gula dan urea terhadap hasil fermentasi nata de pina. *Journal Of Nutrition College*. 8 (1) : 49-52
- Rasyidah. 2020. *Biologi dan Kajian Terapan*. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Sumatera Utara. Medan.

- Rif'anna, A.T., Pramono, Y.B., dan Hintoro, A. Ketebalan sifat organoleptik warna dan tekstur nata dari sari jambu biji dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda. *Jurnal Teknologi Pangan*. 5 (2):53-56.
- Rifdah, Kalsum, U., Anugrah, S.I. 2022. Pengaruh *saccharomyces cerevisiae* terhadap kadar etanol dari kulit nanas secara fermentasi. *Jurnal Teknik Patra Akademika*. 13 (2) : 155-126.
- Rinihapsari, E. dan Richter. 2013. Fermentasi kombucha dan potensinya sebagai minuman kesehatan. *Media Farmasi Indonesia*. 3 (2) : 241-246.
- Rizal, Hardi Mey., Pandiangan, Dewi Masria., dan Saleh, Abdullah. 2013. Pengaruh penambahan gula, asam asetat dan waktu fermentasi terhadap kualitas nata de corn. *Jurnal Teknik Kimia*. 1(19):34-39.
- Rose, D., Ardiningsih, P., dan Idiawati, N. 2018. Karakteristik nata de jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) dengan variasi konsentrasi starter *Acetobacter xylinum*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 7 (4) : 1-7
- Ross, P., Mayer, R., dan Benziman, M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*. 55 (1) : 35-58.
- Schwan, R.F. 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Applied of Environ Microbiology*. 64(4): 1477-1483.
- Shagti, Indhira 2017. Peningkatan protein dan vitamin b melalui pemberian whey dan lerry pada produk nata. *Jurnal Info Kesehatan*. 15(2):495-506
- Suharjono, S., Ardyati, T., Zubaidah, E., Munawaroh, M., dan Pradani, C. 2011. Production of bacterial cellulose from coconut fruit water. *In Proceeding Biology Education Conference: Biology, Science, Environmental, and Learning*. 8(1): 124-128.
- Suzanni, M. A., Munandar, A., dan Saudah, S. 2020. Pengaruh konsentrasi ekstrak nanas (*Ananas comosus*) dan waktu fermentasi pada pembuatan nata de coco dari limbah air kelapa. *Jurnal Serambi Engineering*. 5(2): 1043-1049.
- Taslim, M., Mailoa, M., dan Rijal, M. 2017. Pengaruh pH dan lama fermentasi terhadap produksi ethanol dari *Sargassum crassifolium*. *Jurnal Biologi Science dan Education*. 6 (1) : 13-25.
- Tenriawaru, E.P., Kasi, P.D., dan Supu, I. 2020. Analisis sifat fisik bioselulosa berbahan dasar limbah pulpa kakao. *Cokroaminoto Journal Of Biological Science*. 2 (1) : 6-11

- Tubagus, R. A., Chairunnissa, H., dan Balia, R. L. 2018. Karakteristik fisik dan kimia nata de milko dari susu substandar dengan variasi lama inkubasi. *Jurnal Ilmu Ternak* 18(2):86-94
- Ummiyati, A., Kustyawati, M.E., dan Satyajaya, W. 2024. Kajian nata de ocha sebagai konsumsi pangan: efek penambahan gula dan lama fermentasi terhadap karakteristik nata de ocha. *Jurnal Agroindustri Berkelanjutan*. 3 (1): 134-148.
- 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*. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Widianto, D., Pramita A.D., dan Wedhastri, S. 2013. Perbaikan proses fermentasi biji kakao kering dengan penambahan tetes tebu, khamir, dan bakteri asam asetat. *Jurnal Teknosains*. 1 (3) : 1-80.
- Widiyaningrum, P., Mustikaningtyas, D., dan Priyono, B. 2017. *Evaluasi Sifat Fisik Nata De Coco dengan Ekstrak Kecambah sebagai Sumber Nitrogen. Prosiding Seminar Nasional Pendidikan, Sains dan Teknologi ISBN 978-602-61599-6-0*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Muhammadiyah Semarang: 234 – 239.
- Wilberta, Naja., Sonya, N. G., dan Lydia, S.H. R. 2021. Analisis Kandungan Gula Reduksi Pada Gula Semut Dari Nira Aren Yang Dipengaruhi pH dan Kadar Air. *Jurnal Pendidikan Biologi*. 12 (1) : 101-108.
- Wijaya, H., Muin, R., dan Permata, E. 2017. Karakteristik fisik produk fermentasi kombucha dari berbagai daun berflavanoid tinggi. *Jurnal Teknik Kimia*. 4 (23): 255-262.
- Yanti, N.A., Ahmad, S. W., Tryaswaty, Desty., dan Nurhana, A. 2017. Pengaruh penambahan gula dan nitrogen pada produksi nata de coco. *Biowallacea*. 4 (1): 540-545.
- Yanto, T.K. dan Purnamasari, M.M.D. 2015. Pengaruh jenis dan konsentrasi gula terhadap karakteristik fisikokimia dan sensorial jelly drink. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 8 (2) : 123-129.
- Yunianta. 2010. Limbah cair industri kakao sebagai bahan pembuat nata. *Jurnal Teknik Industri*. 11(1): 31-34.
- Zulfa , Fitriyah dan Rismayanti, Fitriya Devi. 2017. Karakteristik kimia dan sensorial nata de cocoa dari kulit buah dan pulpa coklat (*Theobroma Cocoa L*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 10 (2) : 110-114