

PENINGKATAN KADAR ALKOHOL, ASAM DAN POLIFENOL LIMBAH CAIRAN PULP BIJI KAKAO DENGAN PENAMBAHAN SUKROSA DAN RAGI

The Increased Levels of Alcohol, Acid and Polyphenol Waste of Cocoa Bean Pulp Liquid by the Addition of Sucrose and Yeast

St. Sabahannur¹⁾, Andi Ralle¹⁾

¹⁾Fakultas Pertanian Universitas Muslim Indonesia

Jl. Urip Sumoharjo Km 05, Makassar

Pos-el: siti_sabahan@yahoo.com

Abstract: *The aim of this research is to know the effectiveness of adding yeast and sucrose to increase the level of alcohol, acid and polyphenol liquid of cocoa beans pulp as bioherbisida. The research is arranged in Completely Random Design (RAL) of two factor. The first factor was the addition of yeast with concentration: 0.5% and 1%, the second factor of sucrose concentration consisted of: 0%, 1%, 2%, and 3%. The addition of yeast and sucrose is done at the beginning of fermentation by mixing with wet cocoa beans, then seeds in fermentation for 3 days. The pulp liquid dripping out of the fermentation box is accommodated in Waskom. The parameters observed were: alcohol, total acid, acetic acid, citric acid and polyphenol. The results showed that, the addition of yeast and sucrose significantly affected the increase of alcohol content, total acid, acetic acid, citric acid and polyphenol. The addition of 1% yeast and 2% sugar produced 0.77% alcohol content, 65.25% total acid, citric acid 2740,73 ppm, and acetate acid 3915,33ppm, while the highest polyphenol level was 1056,84 ppm in addition of yeast 1 % and 3% sucrose.*

Keywords: *cocoa pulp, yeast, sucrose, alcohol, polyphenols*

Abstrak: *Penelitian bertujuan mengetahui efektifitas penambahan ragi dan sukrosa pada peningkatan kadar alkohol, asam dan polifenol cairan pulp biji kakao sebagai bioherbisida. Penelitian disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktor. Faktor pertama penambahan ragitape dengan konsentrasi: 0,5% dan 1%, faktor kedua konsentrasi sukrosa terdiri atas: 0%, sukrosa 1%, 2%, dan 3%. Pemberian ragi dan sukrosa dilakukan pada awal fermentasi dengan cara dicampur dengan biji kakao basah, lalu biji difermentasi selama 3 hari. Cairan pulp yang menetes keluar dari kotak fermentasi ditampung dalam Waskom. Parameter yang diamati terdiri atas: kadar alkohol, total asam, asam asetat, asam sitrat dan polifenol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, penambahan ragi dan sukrosa berpengaruh nyata terhadap peningkatan kadar alkohol, total asam, asam asetat, asam sitrat dan polifenol. Penambahan ragi 1% dan gula 2% menghasilkan kadar alkohol 0,77%, total asam 65,25%, asam sitrat 2740,73 ppm, dan asam asetat 3915,33 ppm, sedangkan kadar polifenol tertinggi sebesar 1056,84 ppm pada penambahan ragi 1% dan sukrosa 3%.*

Kata kunci: *pulp kakao, ragi, sukrosa, alkohol, polifenol*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan buah kakao saat ini masih terbatas pada biji dan kulit buah. Buah kakao matang berisi 30-40 biji yang diselubungi oleh *pulp* dan plasenta, sebanyak 68,5% dari berat buah kakao segar terbuang menjadi limbah meliputi: kulit, plasenta, dan *pulp* (Rohan, 1963; Chahyaditha, 2011). *Pulp* merupakan jaringan halus yang berlendir yang membungkus biji kakao, zat yang menyusun *pulp* terdiri atas 80-90% air, glukosa dan sukrosa antara 12-15%, asam-

asam organik dan beberapa asam amino, protein dan lemak, dengan kisaran nilai pH antara 3-4 (Pettipher, 1986; Effendi, 2002; Opeke, 1984; Bintoro, 1977; Warintek, 2001; Nasution *et al.*, 1985; Wood & Lass, 1985; Lopez, 1986). Selama fermentasi dapat dihasilkan cairan *pulp* 15-20% dari berat biji kakao yang difermentasi (Ganda Putra *et al.*, 2008). Cairan lendir *pulp* yang dihasilkan dari proses fermentasi satu ton biji kakao dapat mencapai 75-100 liter (Figuera *et al.*, 1993).

Saat ini pemanfaatan *pulp* kakao belum optimal. Potensi cairan *pulp* yang

cukup besar tersebut selama ini hanya dibuang begitu saja disekitar tempat pengolahan, selain akan mengotori juga dapat berdampak buruk atau mencemari lingkungan disekitarnya. *Pulp* kakao yang selama ini hanya sebagai limbah organik sebenarnya dapat dimanfaatkan sebagai substrat produksi alkohol dan asam asetat. Selain itu limbah *pulp* juga dapat digunakan sebagai bahan baku pembuatan herbisida alami (Kamaruddin dan Sudirman, 2008), hal ini disebabkan *pulp* kakao mengandung alkohol, asam malat, asam sitrat, asam asetat dan polifenol yang merupakan beberapa contoh zat kimia yang bersifat *allelopat*, yaitu dapat menghambat perkecambahan benih.

Untuk meningkatkan kadar alkohol pada cairan *pulp*, maka penambahan sukrosa merupakan salah satu alternatif. Sukrosa sederhana seperti glukosa dapat langsung difermentasi menjadi alkohol. Bahan yang mengandung senyawa yang lebih kompleks seperti pati atau selulosa harus dihidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana sebelum difermentasi menjadi alkohol. Hidrolisis dapat dilakukan secara kimiawi atau menggunakan enzim. Medium sukrosa dapat digunakan dengan penambahan enzim invertase sehingga dapat meningkatkan konsentrasi alkohol yang dihasilkan (Purawisastra *et al.*, 1994).

Sukrosa merupakan gula meja yang dikonsumsi sehari-hari. Sukrosa merupakan gula yang ditemukan dalam tebu, komposisinya terdiri dari fruktosa dan glukosa dengan ikatan glukosiklik berupa jembatan oksigen antara C-1 dari glukosa dan C-2 dari fruktosa dimana kedua jenis sukrosa ini selanjutnya disebut dengan sukrosa invert. Sukrosa invert adalah suatu campuran glukosa dan fruktosa yang ekuimolar. Sukrosa dimanfaatkan sebagai salah satu bahan baku dalam hal penyediaan bioenergi, akan tetapi tahapannya tidak bisa langsung menjadi produk akhir tanpa perubahan menjadi sukrosa sederhana dalam hal ini adalah sukrosa invert. Untuk mempercepat konversinya dibutuhkan sebuah biokatalis atau sering disebut dengan enzim. Enzim memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan katalis

biasa. Organisme penghasil enzim ini beragam jenis tetapi yang paling memiliki kandungan baik intraseluler maupun ekstraseluler dan banyak ditemukan adalah jenis khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Khamir ini mempunyai aktivitas invertase yang tinggi sehingga sukrosa dengan cepat diubah menjadi glukosa dan fruktosa untuk keperluan metabolismenya (Ageng dan Surya Rosa Putra, 2009).

Salah satu jenis *starter* yang mengandung mikroorganisme yang dapat digunakan adalah ragi tape. Ragi tape mengandung *Saccharomyces cerevisiae* yang mempunyai pertumbuhan sempurna pada suhu sekitar 30°C dan pH 4,8. Selain itu pada ragi tape terdapat mikroorganisme yang pada kondisi anaerob akan menghasilkan enzim amilase dan enzim amiloglukosidase, kedua enzim tersebut bertanggungjawab dalam penguraian karbohidrat menjadi glukosa dan maltose. Ragi tape merupakan populasi campuran yang terdiri dari spesies-spesies genus *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenulla*, dan bakteri *Acetobacter* (Tarigan, 1988).

Peningkatan proses fermentasi yang terjadi akibat inokulasi mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* dan beberapa biakan bakteri lain dapat meningkatkan kinerja fermentasi biji kakao (Schwan, 1998; Widiyanto *et al.*, 2013). Susijahadi *et al.* (1998) menjelaskan bahwa konsentrasi awal substrat sukrosa berpengaruh terhadap jumlah alkohol yang dihasilkan, sedangkan Wardani *et al.* (1991) menyatakan, kadar alkohol maksimum yang dapat diperoleh dari 180 g/l sukrosa adalah 12,26% v/v. Apabila konsentrasi alkohol yang dihasilkan lebih besar dari 12 persen, alkohol dapat menghambat pertumbuhan atau bahkan mematikan mikroorganisme. Pada awal fermentasi, mikroorganisme yang aktif adalah khamir (*yeast*) yang memecah sukrosa, glukosa dan fruktosa menjadi etanol. Tujuan dari penelitian adalah untuk meningkatkan kadar alkohol, total asam, asam sitrat, asam asetat dan polifenol cairan *pulp* biji kakao sebagai bahan baku bioherbisida melalui penambahan ragi tape dan sukrosa.

METODOLOGI

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah: buah kakao matang, sukrosa, ragi tape, bahan kimia untuk analisa meliputi: NaOH, indikator pp, akuades, kertas lakmus, kertas whatman, dll.

Alat-alat yang digunakan antara lain: Kotak fermentasi, timbangan analitik, thermometer, pH-meter, waskom, alat titrasi, gelas ukur, pipet, ember.

Rancangan Percobaan

Penelitian disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dua faktor. Faktor pertama ragi tape (R) terdiri dari dua taraf: 0,5% dan 1%. Faktor ke dua sukrosa (G) dengan 4 taraf: Tanpa sukrosa (g0), sukrosa 1% (g1), 2% (g2), dan 3% (g3). Jumlah kombinasi perlakuan delapan, masing-masing diulang 2 kali sehingga terdapat 16 unit perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis dengan Analysis of Variance (ANOVA), apabila perlakuan berpengaruh nyata dilanjutkan dengan uji BNJ α 0,05 untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

Metode Penelitian

Kotak fermentasi yang digunakan dilubangi pada bagian dasarnya, lalu diberi alas daun pisang. Selanjutnya biji kakao basah dimasukkan dalam kotak fermentasi. Biji kakao yang akan difermentasi dicampur sukrosa sesuai perlakuan (0,1%, 2% dan 3%), kemudian dicampur lagi dengan ragi tape sesuai dengan perlakuan (0,5% dan 1%) (ragi terlebih dahulu dihancurkan dengan cara ditumbuk, kemudian diayak dan diaduk hingga homogen). Selanjutnya biji kakao diaduk bersama dengan ragi dan sukrosa agar tercampur rata.

Kotak fermentasi ditempatkan diatas waskom untuk menampung cairan *pulp* yang menetes keluar selama fermentasi berlangsung. Fermentasi dilakukan selama 3 hari sampai cairan *pulp* tidak menetes. Cairan *pulp* disaring dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan kotoran yang tercampur .

Parameter pengamatan

1. Pengujian kadar alkohol dengan metode piknometer (Putri dan Sukandar, 2008)
Kadar alkohol dihitung dengan rumus:

$$R = W_2 - \frac{W_0}{W_1} - W_0$$

Ket: R: bobot jenis (sampel)

W0: piknometer kosong

W1: piknometer yang berisi air suling

W2: bobot piknometer yang berisi destilasi

2. Total asam Titrasi

$$\% \text{TAT} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} (0,1) \times \text{FP} \times 100}{\text{Berat sampel (ml/g)}}$$

3. Kadar Asam Sitrat

$$\% \text{TAT} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} (0,1) \times \text{FP} \times 100 \times \text{C}_6\text{H}_7}{\text{Berat sampel (ml/g)}}$$

4. Kadar Asam Asetat

$$\% \text{TAT} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} (0,1) \times \text{FP} \times 100 \times \text{CH}_3\text{COOH}}{\text{Berat sampel (ml/g)}}$$

5. Kadar polifenol dianalisa dengan Metode Kolorimetri Folin-Ciocalteu Fenol (Lee *et al.*, 2003)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Alkohol

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ragi dan sukrosa berpengaruh sangat nyata terhadap kadar alkohol cairan *pulp* biji kakao. Pengaruh penambahan ragi dan sukrosa terhadap kadar alkohol cairan *pulp* kakao dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Presentase alkohol cairan *pulp* biji kakao

Konsentrasi Sukrosa	Konsentrasi Ragi (%)		BNJ 0,05
	0,5	1	
G0 (0%)	5,93 ^b _x	4,89 ^b _y	2,49
G1 (1%)	7,79 ^a _x	7,81 ^a _x	
G2 (2%)	3,01 ^c _x	0,77 ^c _y	
G3 (3%)	3,28 ^c _y	7,19 ^a _x	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada baris (a,b,c) dan kolom (x,y) yang sama berarti berbeda nyata pada uji BNJ (0,05)

Berdasarkan uji BNJ 0,05 pada Tabel 1, bahwa penambahan ragi 0,5% dan 1% dengan konsentrasi sukrosa 1% menghasilkan cairan *pulp* kakao dengan kadar alkohol 7,79% dan 7,81% dan berbeda nyata dengan sukrosa 0%, 2% dan 3% baik pada penambahan ragi 0,5% maupun 1%. Terjadinya peningkatan kadar alkohol pada konsentrasi ragi 0,5% dan 1% yang mencapai puncaknya pada konsentrasi sukrosa 1% disebabkan karena *S. Cereviceae* mengalami eksponensial fase yaitu fase dimana ragi mengalami pertumbuhan yang sangat cepat karena *S. Cereviceae* mampu menggunakan sejumlah sukrosa, glukosa, fruktosa, galaktosa, mannanosa, maltosa dan maltotriosa (Lewis dan Young, 1990). Selain itu *S. cereviceae* merupakan mikrobia yang paling banyak digunakan pada fermentasi alkohol karena dapat berproduksi tinggi, tahan terhadap kadar alkohol yang tinggi, tahan terhadap kadar sukrosa yang tinggi

dan tetap aktif melakukan aktivitasnya pada suhu 4-32°C (Kartika *et al.*, 1992). Aktivitas ragi banyak dipengaruhi oleh media dan kondisi lingkungan (suhu dan keasaman) dimana panas, konsentrasi ion hidrogen, air dan cahaya mempengaruhi aktivitas pertumbuhan mikroorganisme. Tinggi rendahnya kadar alkohol yang diperoleh sangat dipengaruhi oleh cepat lambatnya sel ragi yang digunakan dalam fermentasi bahan.

Pada tahap awal fermentasi, dengan pH *pulp* yang rendah (3,0-4,0) kandungan sukrosa yang tinggi (8-24%) serta tekanan oksigen yang rendah sangat baik untuk pertumbuhan ragi. Pertumbuhan ragi sangat dominan selama 24-36 jam fermentasi aktivitas ragi sangat kuat dan lebih dari 90% total mikroorganisme adalah ragi. Ragi memegang peranan pada pemecahan sukrosa menjadi alkohol (Lopez, 1986; Schwan *et al.*, 1998; Leerian and Patterson, 1983).

Ragi tape mengandung *Saccharomyces cerevisiae* yang mempunyai pertumbuhan sempurna pada suhu sekitar 30°C dan pH 4,8. Ragi tape merupakan populasi campuran yang terdiri dari spesies-spesies genus *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenulla*, dan bakteri *Acetobacter* (Tarigan, 1988). Menurut Azizah *et al.* (2012), *S. cereviceae* dapat mengkonversi sukrosa menjadi alkohol karena adanya enzim invertase dan *zymase*. Adanya enzim-enzim ini, menyebabkan *S. cereviceae* memiliki kemampuan untuk mengkonversi baik sukrosa dari kelompok monosakarida maupun dari kelompok disakarida. Jika sukrosa yang tersedia dalam substrat merupakan sukrosa disakarida maka enzim invertase akan bekerja menghidrolisis disakarida menjadi monosakarida. Setelah itu, enzim *zymase* akan mengubah monosakarida menjadi alkohol dan CO₂.

Lama fermentasi yang paling optimal untuk proses pembuatan bioalkohol adalah 3 hari. Jika fermentasi dilakukan lebih dari 3 hari, justru kadar alkoholnya dapat berkurang. Berkurangnya kadar alkohol disebabkan karena alkohol telah dikonversi menjadi senyawa lain. Fermentasi alkohol

merupakan suatu reaksi perubahan glukosa menjadi alkohol (etil alkohol) dan karbondioksida fermentasi ini berlangsung dalam keadaan anaerob (Azizah, 2012).

Total Asam

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan, bahwa penambahan ragi dan sukrosa berpengaruh sangat nyata terhadap total asam tertitrisasi pada cairan *pulp* biji kakao. Pengaruh penambahan ragi dan sukrosa terhadap total asam cairan *pulp* biji kakao dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Presentase kadar asam cairan *pulp* biji kakao

Konsentrasi Sukrosa	Konsentrasi Ragi (%)		BNJ 0,05
	0,x5	1%	
G0 (0%)	19,78 ^a _x	16,78 ^c _y	6,48
G1 (1%)	14,47 ^c _x	16,03 ^c _x	
G2 (2%)	21,75 ^a _y	65,25 ^a _x	
G3 (3%)	17,34 ^b _x	19,59 ^b _x	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada baris (a,b,c) dan kolom (x,y) yang sama berarti berbeda nyata pada uji BNJ (0.05)

Berdasarkan hasil uji BNJ 0,05 pada Tabel 2, bahwa kandungan asam pada cairan *pulp* kakao terbanyak yaitu 65,25% pada penambahan ragi 1% dan sukrosa 2% dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, sedangkan kandungan asam terendah ditunjukkan pada penambahan sukrosa 1% dengan konsentrasi ragi 0,5% dan 1%. Semakin tinggi konsentrasi ragi yang digunakan maka mikroba yang terdapat pada *pulp* semakin banyak, sehingga total asam yang dihasilkan juga meningkat. Peningkatan total asam disebabkan terbentuknya asam-asam organik sebagai hasil akhir fermentasi yaitu berupa asam asetat dan asam laktat. Asam ini terbentuk dari sukrosa yang ditambahkan dan juga sukrosa, glukosa dan fruktosa yang secara alami terdapat pada *pulp* biji. *Pulp* yang tebal berarti mengandung

sukrosa yang banyak, selanjutnya sukrosa mengalami fermentasi menjadi alkohol, fermentasi alkohol menghasilkan asam yang banyak pula. Apabila dihubungkan dengan kadar alkohol (Tabel 1), bahwa terjadi penurunan kadar alkohol pada konsentrasi ragi 1% dan sukrosa 2%, karena sebagian besar alkohol sudah dirombak menjadi asam. Hasil dari penguraian alkohol menghasilkan asam-asam organik seperti asam laktat dan asam asetat. Asam-asam tersebut akan berpengaruh terhadap keasaman (pH) biji setelah fermentasi (Ardhana dan Fleet, 2003; Ramlah & Daud, 2009; Guehi *et al.*, 2010; Pasau, 2013).

Jenis ragi yang umum terdapat pada tumpukan biji kakao selama fermentasi adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces theobromae*, *Saccharomyces ellipsoides*, *Saccharomyces apiculatus* dan *Saccharomyces apimulus* (Nasution *et al.*, 1985). *Saccharomyces cerevisiae* dan *Candida tropicalis* merupakan ragi dominan selama fermentasi kakao (Ardhana dan Fleet, 2003). Bakteri asam laktat merupakan bakteri penghasil sejumlah besar asam laktat sebagai hasil akhir dari metabolisme sukrosa. Asam laktat yang dihasilkan dengan cara tersebut akan menurunkan nilai pH lingkungan pertumbuhannya dan menimbulkan rasa asam (Sulistiyowati dan Soenaryo, 1989; Alamsyah, 1991).

Selain itu oksigen yang semula terhalang oleh lapisan *pulp* dapat masuk kedalam tumpukan biji. Kondisi aerob (kaya oksigen) dimanfaatkan oleh bakteri aseto-bakteri untuk mengubah alkohol menjadi asam asetat dengan mengeluarkan bau khas yang menyengat. Jenis bakteri asam laktat *Lactobacillus cellobiosus* dominan sampai 48 jam dan *Acetobacter pasteurianus* merupakan golongan bakteri asam asetat yang paling lama bertahan hidup dibanding *Acetobacter aceti* yang aktif pada 24 jam pertama fermentasi.

Walaupun *pulp* mengandung asam-asam organik tetapi bakteri ini tidak beraktifitas pada awal fermentasi karena kondisi ekstrinsik tidak tersedianya oksigen. Laju pertumbuhan bakteri asam asetat akan meningkat setelah tersedianya oksigen dan

alkohol hasil perombakan bakteri asam laktat dan ragi. Oleh bakteri asam asetat, alkohol dioksidasi menjadi asam asetat dan asam asetat dioksidasi menjadi CO₂ dan air (air ini akan keluar dari *box* fermentasi).

Asam Sitrat

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ragi dan sukrosa pada fermentasi biji kakao berpengaruh sangat nyata terhadap kandungan asam sitrat cairan *pulp* kakao. Perbedaan kadar asam sitrat cairan *pulp* biji kakao pada berbagai konsentrasi ragi dan sukrosa dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kadar asam sitrat cairan *pulp* biji kakao (ppm)

Konsentrasi Sukrosa	Konsentrasi Ragi (%)		BNJ 0,05
	0,5	1	
G0 (0%)	830,88 ^b _x	704,87 ^b _y	90,25
G1 (1%)	614,86 ^c _x	610,36 ^c _y	
G2 (2%)	929,33 ^a _y	2740,73 ^a _x	
G3 (3%)	728,50 ^c _y	823,01 ^b _x	

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang diikuti oleh huruf yang berbeda (a,b,dan c) dan pada baris yang berbeda (x,y) berarti berbeda nyata pada uji BNJ (0.05)

Berdasarkan uji BNJ 0,05 pada Tabel 3 menunjukkan, bahwa penambahan ragi 1% dan sukrosa 2% memberikan kadar asam sitrat tertinggi (2740,73 ppm) dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Fermentasi pada biji kakao terjadi dalam dua tahap yaitu fermentasi anaerob dan fermentasi aerob. Keberadaan asam sitrat membuat lingkungan *pulp* menjadi asam sehingga akan menginisiasi pertumbuhan ragi dan terjadi fermentasi secara anaerob. Khamir *S. Cerevisiae* tumbuh dengan baik pada lingkungan dengan keadaan aerobik, namun akan melakukan fermentasi terhadap gula jauh lebih cepat pada keadaan anaerobik. Turutnya *pulp* selama fermentasi diduga turut menurunkan kadar asam sitrat sehingga menyebabkan peningkatan pH.

Asam Asetat

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ragi dan sukrosa berpengaruh sangat nyata terhadap kadar asam asetat cairan *pulp* biji kakao. Perbedaan kadar asam asetat cairan *pulp* kakao pada berbagai konsentrasi ragi dan sukrosa dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata kadar asam asetat cairan *pulp* biji kakao (ppm)

Konsentrasi Sukrosa	Konsentrasi Ragi (%)		BNJ 0,05
	0,5	1	
G0 (0%)	1186,98 ^b _x	1006,96 ^c _y	1388,31
G1 (1%)	871,95 ^d _y	961,96 ^c _x	
G2 (2%)	1327,61 ^a _y	3915,33 ^a _x	
G3 (3%)	1040,71 ^c _y	1175,73 ^b _x	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada baris (a,b,c) dan kolom (x,y) yang sama berarti berbeda nyata pada uji BNJ (0.05)

Berdasarkan uji BNJ 0,05 pada Tabel 4, bahwa penambahan ragi 1% dan sukrosa 2% menunjukkan kandungan asam asetat lebih tinggi yaitu 3915,33 ppm dan berbeda nyata dengan perlakuan lainnya, sedangkan kandungan asam asetat cairan *pulp* lebih rendah pada penambahan ragi 0,5 dan 1%, dengan sukrosa 1%. Penambahan ragi 1% dan sukrosa 2% akan meningkatkan proses fermentasi, di mana sukrosa merupakan substrat yang akan dirombak oleh ragi menjadi etanol. Selanjutnya etanol akan diubah menjadi asam asetat (Chandra *et al.*, 1990). Kandungan gula di dalam *pulp* dan penambahan sukrosa akan meningkatkan substrat yang dapat dirombak menjadi etanol, sedangkan inokulasi ragi meningkatkan jumlah mikrobia yang bekerja merombak gula menjadi etanol. Fermentasi asam asetat membutuhkan medium yang mengandung etanol 10-13%.

Peningkatan proses fermentasi yang terjadi akibat inokulasi mikroorganisme telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Sebagaimana Schwan (1998) dalam penelitiannya melaporkan bahwa

penambahan biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* dan beberapa biakan murni bakteri lain dapat meningkatkan kinerja fermentasi biji kakao.

Pada Tabel 4 juga memperlihatkan mulai terjadi penurunan kadar asam asetat 1040,71 ppm apabila konsentrasi sukrosa ditingkatkan menjadi 3% pada penambahan ragi 0,5% dan kadar asam asetat 1175,73 ppm pada ragi 1%. Hal ini berkaitan dengan meningkatnya konsentrasi etanol yang dihasilkan. Apabila konsentrasi etanol terlalu tinggi, pembentukan asam asetat akan terganggu, sehingga fermentasi etanol menjadi asam asetat tidak berlangsung dengan sempurna (Darwis dan Sukara, 1989). Damanhuri (2004) menjelaskan fermentasi asam asetat dengan substrat etanol 16,10% menghasilkan 0,11% asam asetat dengan lama fermentasi selama 5 minggu. Asam asetat merupakan hasil dua tahap proses fermentasi dimana tahap pertama adalah fermentasi sukrosa menjadi etanol oleh khamir, sedangkan tahap kedua adalah oksidasi etanol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat (Luwihana, 1998). Substrat dalam fermentasi biji kakao adalah gula dan asam sitrat yang terkandung dalam pulp. Proses fermentasi mikrobial pelaku fermentasi akan merombak *pulp* menjadi asam-asam organik, selanjutnya Effendi (2002) menyatakan, pada fermentasi etanol hasil fermentasi limbah cair *pulp* kakao oleh *A. Aceti* B127 dengan kondisi suhu 30°C, nilai pH awal 4, konsentrasi etanol 5% (v/v), inokulum 10% (v/v), dengan kecepatan pengadukan terbaik 400 rpm menghasilkan asam asetat 4,24%. Produksi asam sangat bergantung pada tingkat kesuburan pertumbuhan sel bakteri dan tingkat kesuburan tersebut menurun seiring dengan peningkatan kadar etanol substrat (Soedarini *et al.*, 1998).

Polifenol

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ragi dan sukrosa berpengaruh sangat nyata terhadap kadar polifenol cairan *pulp*. Untuk mengetahui perbedaan kadar polifenol cairan pulp biji kakao dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rata-rata kadar polifenol cairan pulp biji kakao (ppm)

Kon- sentralasi Sukrosa	Konsentrasi Ragi (%)		BNJ 0,05
	0,5	1	
G0 (0%)	1047,36 ^a _x	804,66 ^a _x	278,61
G1 (1%)	872,06 ^a _x	840,36 ^a _x	
G2 (2%)	702,23 ^b _x	886,76 ^a _x	
G3 (3%)	920,84 ^a _x	1056,84 ^a _x	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada baris (a,b,c) dan kolom (x,y) yang sama berarti berbeda nyata pada uji BNJ (0.05)

Berdasarkan uji BNJ taraf 0,05 pada Tabel 5 menunjukkan, bahwa penambahan ragi 1% dan sukrosa 3% menghasilkan polifenol 1056,84 ppm lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya, sedangkan ragi 0,5% dengan sukrosa 2% menghasilkan polifenol hanya 702,23 ppm. Seperti diketahui bahwa *pulp* kakao mengandung sejumlah asam-asam organik seperti asam malat, asam sitrat dan asam asetat selain itu *pulp* kakao juga mengandung senyawa polifenol sebanyak 0,17% yang larut dalam air dan sebanyak 0,15% yang larut dalam alkohol (Anvoh *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2007). Senyawa asam organik tersebut bersama polifenol merupakan zat kimia yang bersifat allelopati yaitu dapat menghambat perkecambah biji tanaman (Li *et al.*, 2010; Sing *et al.*, 2001).

Menurut Berri (1985), senyawa fenol berpengaruh terhadap enzim hidrolisis yang berperan dalam memecah cadangan makanan menjadi senyawa-senyawa yang siap dimetabolisme. Kemampuan penghambatan senyawa fenol tergantung konsentrasi (Salisbury dan Ross, 1995), pada konsentrasi tinggi senyawa fenol dapat menaikkan tekanan osmosis, sehingga menghambat difusi air dan oksigen ke dalam biji (Salisbury dan Ross, 1995; Gardner *et al.*, 1991), serta menghambat transport asam amino dan pembentukan protein (Rice, 1984).

Asam fenolat merupakan salah satu dari belasan alelokimia (senyawa penyebab allelopati yang dapat menghambat

pertumbuhan tanaman lain disekitarnya). Alelokimia dari senyawa fenol menghambat pertumbuhan tanaman melalui beberapa cara, antara lain dengan menghambat pembelahan dan pemanjangan sel, menghambat kerja hormon, mengubah pola kerja enzim, menghambat proses respirasi, menurunkan kemampuan fotosintesis, mengurangi pembukaan stomata, menghambat penyerapan air dan hara serta menurunkan permeabilitas membran (Einhellig, 1995; Devi *et al.*, 1997).

Fenol merupakan senyawa kimia yang banyak dimanfaatkan sebagai insektisida, herbisida dan fungisida. Sebagai herbisida, fenol sangat tinggi toksisitasnya, bersifat non selektif dan bekerja secara efektif merupakan herbisida organik dan sebagian besar bersifat kontak (Oudejans, 1991).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan ragi dan sukrosa pada awal fermentasi biji kakao berpengaruh sangat nyata terhadap kadar alkohol, total asam, asam asetat, asam sitrat dan polifenol cairan *pulp* biji kakao. Penambahan ragi 1% dan gula 2% menghasilkan kadar alkohol 0,77%, total asam 65,25%, asam sitrat 2740,73 ppm, dan asam asetat 3915,33ppm, sedangkan kadar polifenol terbaik sebesar 1056,84 ppm pada penambahan ragi 1% dan sukrosa 3%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Ristek dan Pendidikan Tinggi atas bantuan dana Penelitian dalam skim Penelitian Terapan, dan Universitas Muslim Indonesia yang telah memberikan izin penelitian, sehingga penelitian dapat dilaksanakan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ageng S., D., Surya Rosa Putra, 2009. Profil Fermentasi Sukrosa Menjadi Etanol Menggunakan *Zymomonas Mobilis* Yang Dikoamobilkan Dengan Ekstrak Kasar Invertase. *Prosiding Tugas Akhir Semester Genap 2008/2009. Prosiding KIMIA FMIPA – ITS*.
2. Alamsyah, T.S. 1991. *Peranan fermentasi dalam pengolahan biji kakao kering. Suatu Tinjauan. Berita Perkebunan, 1 (2) : 97-103.*
3. Anvoh, K.Y.B., A. Zoro-Bi and D. Gnakri. 2009. Production and characterization of juice from mucilage of cocoa beans and its transformation into marmalade. *Pakistan Journal of Nutrition 8(2): 129-133.*
4. Ardhana, M.M. & G.H. Fleet, 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentation in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology 86, 87-99.*
5. Azizah N., A. N. Al-Baarri, S. Mulyani, 2012. *Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, Dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas.* Semarang: Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro
6. Bintoro, M.H. 1977. *Periode Cukup Panen, Panen dan Periode Setelah Panen Coklat.* IPB-Press. Bogor.
7. Chahyadiha E.M. 2011. *Pembuatan Pektin dari Kulit Buah Kakao dengan Kapasitas Produksi 20.000 Ton / Tahun.* Universitas Sumatra.
8. Darwis A.A, Sukara E. 1989. Penuntun Praktikum Isolasi, Purifikasi, dan Karakterisasi Enzim. Laboratorium Bioindustri, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor.
9. Devi, S.R., Pellisier dan Prasad. 1997. *Allelochemical. In: M.N.V.Prasad (Eds). 1997. Plant Ecophysiology. John Willey and Sons, Inc. Toronto, Canada. 253-303 hlm.*
10. Dias, D.R., R.F. Schwan, E.S. Freire and R.D.S. Serodio. 2007. *Elaboration of a fruit wine from cocoa (Thebroma cacao L.) pulp.* *International Journal of Food Science and Technology 42: 319-329*
11. Effendi, M.S. 2002. Kinetika fermentasi asam asetat (vinegar) oleh bakteri *Acetobacter aceti* B127 dari etanol hasil fermentasi limbah cair *pulp* kakao. *J Teknol Ind Pert 13:125-135.*

12. Figueira, A., J. Janick and J.N. BeMiller. 1993. New products from Theobroma cacao: Seed pulp and pod gum. In J. Janick and J.E. Simon (eds.). New Crops. Wiley, New York. p. 475-478.
13. Ganda-Putra, G.P., Harijono, S. Kumalaningsih dan Aulani'am. 2008. Optimasi kondisi depolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim polygalaturonase endojinus. *Jurnal Teknik Industri* 9 (1): 24-34.
14. Guehi, S.T., S. Dabone, L. Ban-Koffi, D.K. Kra, and G.I. Zahouli, 2010. Effect of turning beans and fermentation method on the acidity and physical quality of raw cocoa beans. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2:163-171.
15. Lehrian, D.W and G.R. Patterson. 1983. *Cocoa fermentation*, p. 529-575. In G.Reed (ed), *Biotechnology, comprehensive treatise*, vol 5.verlag Chemie, Basel, Switzerland.
16. Li Z.H., Q. Wang, X. Ruan, C.D. Pan. and D.A. Jiang. 2010. Phenolic and plant allelopathy. *Molecules* 15:8933-8952.
17. Lopez, A.S. 1986. The cocoa pulps soft drink industry in brazil and its effercts on head fermentation. *International Cocoa Research Conference*.
18. Nasution MZ, Tjiptadi W dan Laksmi BS. 1985. *Pengolahan Cokelat*. Bogor , Agroindustri Press.
19. Oudejans, JH. 1991. *Agro Pesticides: Properties and Function in Integrated Crop Protection*. United Nations Bangkok. 329 hlm.
20. Opeka LK. 1984. *Optimising economic returns(profit) from cocoa cultivation trougheconomic efficient use of cocoa by product*. Dalam Sulistyowati, Atmawinata O, Muloto S, Yusianto. 1998. Pemenfaatan limbah bubuk pulp kakao untuk pembuatan nata kakao. *Pelita Perkebunan* 14: 63 – 75.
21. Pasau,C.,2013.*Efektivitas penggunaan asam asetat pada pemeraman biji kakao segar sebagai analog fermentasi*.*E-j. agrotekbis* 1 (2) : 113-120.
22. Pettipher, G. L. 1986. Analysis of cocoa pulp and the formulation of a standardised artificial cocoa pulp medium. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 37:297–309.
23. Ramlah, S. & Daud, D. 2009. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Warna dan Citarasa Biji Kakao. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan*, 4: 24-30.
24. Rohan,T.A. 1963. *Proccesing of Raw Cocoa for The Market*. Food and Agricultural Organization of The United National, Rome
25. Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Terjemahan Lukman dan Sunaryono. ITB, Bandung. 338p
26. Schwan, R.F. 1998. *Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum*. *Appl. Environ Microbiol.*, 64 (4) : 1477-1483.
27. Sulistyowati dan Soenaryo. 1989. *Optimasi Lama Fermentasi dan Perendaman Biji Kakao Mulia*.*Pelita Pekebunan*. Vol. 5 (1): 37-45.
28. Sing, H.P., R.K. Kohli. and D.R. Batish. 2001. Allelopathy in agroeco systems : An overview. *Journal of Crop Production* 4: 1-41.