

Analisis Kadar Asam Asetat Dalam Media Limbah Fermentasi Biji Kakao Akibat Penambahan Konsentrasi *Acetobacter Aceti* Dan Waktu Inkubasi

Wiwik Kusmawati

Program Studi Pendidikan Biologi FPIEK
IKIP Budi Utomo Malang
Jl. Simpang Arjuno 14 B Malang
wiwikkusmawati@gmail.com

Abstract: *This study aims to determine the effect of Acetobacteraceti concentration and incubation time on levels of acetic acid in the vinegar fermentation of cocoa beans waste media. This study uses a completely randomized design (CRD) arranged as factorial, consisting of two factors and repeated three times. The first factor is the concentration of Acetobacteraceti which consists of three levels, namely Acetobacteraceti starter concentration of 10% (A₁), 13% (A₂) and 16% (A₃). While the second factor is the time of incubation for 6 days (W₁), 8 days (W₂) and 10 days (W₃). Results of analysis of variance showed that the concentration of Acetobacteraceti and incubation time affect the concentration of acetic acid in the vinegar fermentation of cocoa beans waste media. While Duncan's test results showed the treatment inoculation 13% starter Acetobacteraceti with 6 days of incubation time significantly different from the other treatments with maximum acetic acid content is 4,02%. So that these results meet the standards of vinegar.*

Keywords: *aceticacid levels, Acetobacteraceti, wastefermentation of cocoa beans.*

Vinegar merupakan salah satu asam organik yang paling penting karena banyak digunakan dalam industri untuk memproduksi asam-asam alifatik, pembuatan obat-obatan (aspirin), pembuatan warna (indigo) dan parfum (Tjokroadikoesoemo, 1993). Sedangkan vinegar dalam industri makanan berfungsi sebagai agen anti mikrobial dan meningkatkan cita rasa (Douglas dan Glen, 1982). Menurut Rahman (1992) vinegar dapat dibuat dari bahan baku yang mengandung gula, termasuk juga dari limbah fermentasi biji kakao. Apalagi perkembangan luas tanaman kakao pada Pelita V lebih dari 400.000 hektar. Sehingga dapat diperhitungkan produksi kakao di Indonesia akan mencapai sekitar 250.000 ton di akhir tahun 1990-2000 (Anonymous, 1988).

Tersedianya bahan baku yang cukup melimpah menunjukkan bahwa Indonesia sangat berpotensi untuk mengembangkan produksi vinegar. Namun, pada kenyataannya sampai saat ini Indonesia masih mengimpor vinegar yang cukup besar.

Limbah fermentasi biji kakao diperoleh sesudah biji kakao difermentasi. Lama waktu fermentasi biji kakao tergantung pada jenis kakao yang akan difermentasi. Fermentasi dimaksudkan

untuk memperoleh biji kakao kering dengan aroma dan warna yang disukai konsumen. Selama itu pula enzim menguraikan senyawa polifenol, protein dan gula yang selanjutnya akan menghasilkan senyawa aroma, perbaikan cita rasa dan perubahan warna (Iswanto, 1997). Pada akhir fermentasi timbul bau asam cuka yang keras dan pulp mudah dilepaskan. Melepasnya pulp dari biji menghasilkan cairan yang selain merembes ke dalam biji, juga mengalir keluar melalui lubang kotak fermentasi (Alamsyah, 1991). Cairan ini merupakan limbah yang berasal dari pulp dan belum dimanfaatkan atau dibuang begitu saja. Menurut Ardhana (1990) biji kakao yang telah difermentasi selama 18 jam akan menghasilkan cairan dengan kadar etanol sampai 12%, glukosa sampai 8%, sukrosa 6,1% dan asam asetat sampai 5,27%. Sedangkan Junianto (1995) mengatakan limbah ini menghasilkan asam asetat 0,22%, alkohol 3,9% dan gula reduksi 17,299%. Terbentuknya vinegar memerlukan dua proses. Proses pertama adalah pengubahan gula menjadi alkohol oleh khamir (fermentasi alkoholik). Proses kedua adalah pengubahan etanol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat (fermentasi oksidatif) (Frazier dan Westhoff, 1983).

Menurut Desrosier (1977) pada fermentasi

oksidatif, starter atau bibit yang cocok harus ditambahkan untuk menyediakan jenis bakteri yang diperlukan. Starter yang baik adalah berasal dari biakan murni (Sa'id, 1987). Strain yang digunakan untuk produksi asam asetat adalah *Acetobacter aceti* karena kemampuannya dibawah kondisi aerasi dan keasaman yang tinggimengubah etanol secara cepat dengan hasil asam asetat tinggi (Crueger dan Anneliese, 1992). Sehingga penelitian mengenai galur *Acetobacter aceti* yang dapat mengubah etanol menjadi asam asetat dapat menjadikan cara pembuatan asam cuka dengan fermentasi oksidatif menjadi penting kembali (Sardjoko, 1991).

Pemberian starter dilakukan dengan cara menuangkan hasil biakan bakteri *Acetobacter aceti* ke dalam fermentor. Menurut Wibowo *et al.* (1990) proporsi starter pada umumnya 3-10% dibanding volume total media. Persiapan starter dilakukan agar fase adaptasi dalam media fermentasi seminimal mungkin, sehingga proses fermentasinya berlangsung lebih cepat. Sedangkan Purwaningsih (1989) mengatakan starter *Acetobacter aceti* yang ditambahkan pada fermentor kurang lebih sebanyak 10% dari volume medium. Rahman (1992) mengatakan pada pembuatan vinegar dari aren nira, starter yang ditambahkan kurang lebih sebanyak 20% dari volume medium. Dan waktu inkubasi akan memperbaiki cita rasa dan kadar asam asetat yang dihasilkan (Desrosier, 1977).

Selama fermentasi oksidatif itu *Acetobacter aceti* mengoksidasi etanol dan menghasilkan asam asetat. Starter *Acetobacter aceti* 11,5% akan menghasilkan kadar asam asetat 5% dan efisiensi pengubahan sekitar 86% (Pudjiraharti *et al.*, 1988). Di samping itu selama fermentasi, pH berubah menurun. Penurunan pH terjadi apabila memproduksi asam-asam organik misalnya asam asetat, asam laktat dan lain-lain (Sa'id, 1987). Perubahan pH yang terjadi pada medium fermentasi masih dalam batas toleransi optimum untuk proses fermentasi aerob dan pertumbuhan *Acetobacter aceti* yakni 3,0-4,0 sehingga tidak perlu penambahan buffer (Pudjiraharti *et al.*, 1988).

Dari penelitian yang pernah dilakukan oleh Pudjiraharti *et al.* (1988) konsentrasi starter *Acetobacter aceti* pada media anggur buah jambu mete berpengaruh terhadap kadar asam asetat vinegar. Masalah yang timbul adakah pengaruh konsentrasi *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi terhadap kadar asam asetat vinegar dalam media limbah fermentasi biji kakao?

METODE

Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan cara menampung tetesan limbah fermentasi biji kakao pada lembaran plastik yang diletakkan dibawah kotak fermentasi biji kakao. Plastik ini dipasang sejak biji kakao yang baru dipetik, dimasukan didalam kotak fermentasi. Plastik dipasang sekitar 18 jam untuk menampung limbah yang mengalir dari kotak fermentasi, limbah yang tertampung dalam plastik dimasukkan ke dalam botol-botol kaca steril. Botol-botol ini ditutup dengan aluminium foil dan plastik. Kemudian dimasukkan didalam termos yang telah diisi dengan es dan dibawa ke Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang.

Pemeliharaan Kultur

Untuk fermentasi alkoholik digunakan kultur murni *Saccharomyces cerevisiae* yang dipelihara pada media Malt Extract Agar Miring selama 24 jam pada suhu 30°C. Sedangkan untuk fermentasi oksidatif digunakan *Acetobacter aceti* yang dipelihara padamedia agar miring selama 24 jam pada suhu 30°C.

Pembuatan Starter

Untuk fermentasi alkoholik kultur *Saccharomyces cerevisiae* yang telah ditanam pada media Malt Extract Agar Miring diambil 2 ose dan diinokulasikan ke dalam 578 ml media limbah fermentasi biji kakao yang telah dipasteurisasi selama 15 menit pada suhu 72°C. Selanjutnya diaerasi 12-14 gelembung per menit dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar (25-29°C). Setelah inkubasi media ini dipakai sebagai starter.

Untuk fermentasi oksidatif biakan murni *Acetobacter aceti* yang telah ditanam pada media agar miring diambil 2 ose dan diinokulasikan ke dalam 5 ml media cair dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Setelah waktu yang ditentukan tercapai, dari media cair diinokulasikan ke dalam 150 ml media limbah fermentasi biji kakao yang telah dipasteurisasi selama 15 menit pada suhu 72°C. Kultur ini kemudian diaerasi 12-14 gelembung per menit dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu kamar. Setelah inkubasi media ini dipakai sebagai starter.

Proses Fermentasi

Limbah fermentasi biji kakao yang telah diperoleh dimasukkan pada botol (sebagai fermentor alkoholik) sebanyak 1000 ml secara aseptis dan dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan sampai sekitar 30-31°C.

Setelah dingin (30°C) diinokulasi dengan starter *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 10% dari volume substrat dalam fermentor (= 100 ml) dan ditutup dengan kapas, diinkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari atau sampai pembentukan gelembung CO₂ berhenti.

Agar tidak mengganggu proses fermentasi selanjutnya, *Saccharomyces cerevisiae* yang terdapat pada fermentor dimatikan terlebih dahulu, dengan cara substrat bersama fermentor dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 menit. Disamping itu diamati pula apakah *Saccharomyces cerevisiae* telah mati atau belum dengan cara mengamati dibawah mikroskop, menggunakan pewarnaan larutan methylen blue. Apabila *Saccharomyces cerevisiae* yang ditemukan ternyata masih hidup, ditunjukkan dengan warna jernih maka lama pasteurisasi ditambah hingga tidak ditemukan lagi adanya *Saccharomyces cerevisiae* yang masih hidup. Setelah proses fermentasi alkoholik berakhir dilakukan pengambilan sampel dan pengukuran kadar alkohol.

Untuk menuju proses oksidasi etanol menjadi asam asetat, substrat yang telah dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 menit, dalam keadaan panas substrat dipindahkan ke dalam botol fermentor untuk fermentasi oksidasi yang sudah disterilkan terlebih dahulu sebanyak 100 ml. Substrat yang telah dingin diinokulasi dengan starter *Acetobacter aceti* secara aseptis dengan perlakuan:

- 1 = Konsentrasi *Acetobacter aceti* 10% dari volume substrat
- 2 = Konsentrasi *Acetobacter aceti* 13% dari volume substrat
- 3 = Konsentrasi *Acetobacter aceti* 16% dari volume substrat

Kemudian diaerasi 12-14 gelembung per menit dan diinkubasi pada suhu kamar. Pengukuran kadar asam asetat dilakukan pada hari ke-6, ke-8 dan ke-10.

Pengukuran Kadar Asam Asetat

Pengukuran kadar asam asetat dilakukan dengan cara titrasi. Masing-masing sampel diambil sebanyak 2 ml kemudian dipindahkan ke dalam erlenmeyer. Sebelum dititrasi terlebih dahulu diencerkan dengan menambahkan 8 ml akuades. Selanjutnya diberi PP 1% sebanyak 2 tetes, sampel siap dititrasi dengan NaOH 0,1 N. Untuk menghitung kadar asam asetat digunakan persamaan sebagai berikut (Atikah, 1987):

$$\frac{(V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times BE \text{ Asam Asetat} \times \text{Pengenceran})}{(M \text{ Sampel} \times 1000)} \times 100\%$$

Analisis Data

Jika data berdistribusi normal dan varian datanya homogen, maka data tersebut dianalisis dengan analisis sidik ragam dan uji beda jarak nyata Duncan's.

HASIL PENELITIAN

Berdasarkan dari hasil penelitian diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 1 Kadar asam asetat (%) hasil fermentasi oksidatif limbah fermentasi biji kakao

| Perlakuan | Ulangan | | | Total | Rerata |
|-------------------------------|---------|-------|------|-------|--------|
| | I | II | III | | |
| A ₁ W ₁ | 1,9 | 1,2 | 1,5 | 4,6 | 1,53 |
| A ₁ W ₂ | 1,01 | 1,4 | 0,7 | 3,11 | 1,04 |
| A ₁ W ₃ | 0,75 | 0,1 | 0,1 | 0,95 | 0,32 |
| A ₂ W ₁ | 4,2 | 4,56 | 3,29 | 12,05 | 4,02 |
| A ₂ W ₂ | 2,46 | 1,25 | 1,8 | 5,51 | 1,84 |
| A ₂ W ₃ | 1,01 | 0,42 | 0,35 | 1,78 | 0,59 |
| A ₃ W ₁ | 0,9 | 2,04 | 0,85 | 3,79 | 1,26 |
| A ₃ W ₂ | 1,6 | 0,56 | 0,56 | 2,72 | 0,91 |
| A ₃ W ₃ | 0,3 | 0,04 | 0,81 | 1,15 | 0,38 |
| Total | 14,13 | 11,57 | 9,96 | 35,66 | 11,89 |

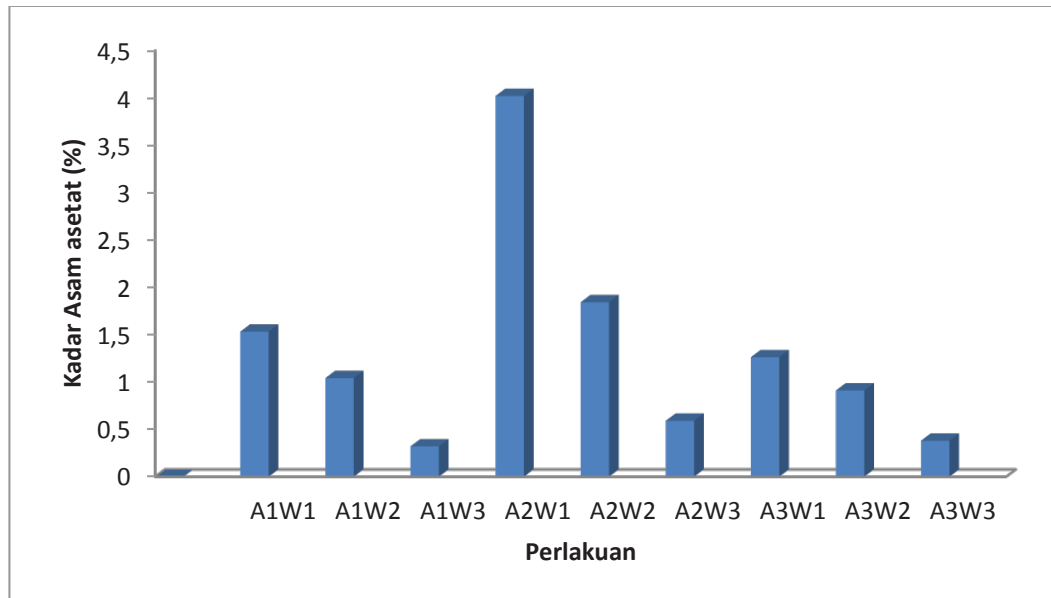


Diagram 1 Rata-rata kadar asam asetat (%) hasil fermentasi oksidatif limbah fermentasi biji kakao

Keterangan:

A_1W_1 = Inokulasi 10% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 6 hari.

A_1W_2 = Inokulasi 10% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 8 hari.

A_1W_3 = Inokulasi 10% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 10 hari.

A_2W_1 = Inokulasi 13% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 6 hari.

A_2W_2 = Inokulasi 13% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 8 hari.

A_2W_3 = Inokulasi 13% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 10 hari.

A_3W_1 = Inokulasi 16% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 6 hari.

A_3W_2 = Inokulasi 16% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 8 hari.

A_3W_3 = Inokulasi 16% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 10 hari.

PEMBAHASAN

Dari hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi *Acetobacter aceti*, waktu inkubasi dan interaksi konsentrasi *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi berpengaruh nyata terhadap kadar asam asetat.

Dan uji beda jarak nyata Duncan's pada taraf 5% menunjukkan kadar asam asetat maksimum yaitu 4,02% pada perlakuan inokulasi 13% starter *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 6 hari dan ternyata berbeda nyata dengan perlakuan

lain sedangkan kadar asam asetat minimum yaitu 0,32% pada perlakuan 10% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 10 hari.

Perlakuan inokulasi 13% starter *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 6 hari dari biakan murni ke dalam media yang kondisi lingkungannya terutama pada pH, suhu, nutrisi, sumber karbon, mineral, vitamin dan asam amino yang mendukung pertumbuhan *Acetobacter aceti* menyebabkan bakteri memerlukan waktu untuk beradaptasi dengan lingkungan yang baru tersebut. Jika semakin banyak starter yang ditambahkan maka semakin cepat bakteri asam asetat mengalami fase adaptasinya. Adaptasi ini ditandai dengan peningkatan jumlah sel bakteri. Setelah mengalami fase penyesuaian diri maka bakteri akan tumbuh dengan maksimal. *Acetobacter aceti* merupakan bakteri spesifik yang mempunyai kemampuan untuk membentuk asam asetat dari oksidasi alkohol. Dengan adanya *Acetobacter aceti* dalam jumlah banyak pada perlakuan inokulasi 13% starter *Acetobacter aceti* dengan waktu inkubasi selama 6 hari yang merupakan waktu yang optimal untuk mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat, dibanding dengan perlakuan lain menyebabkan fermentasi oksidatif berlangsung lebih cepat untuk mengoksidasi seluruh alkohol menjadi asam asetat, sehingga produksi asam asetat yang dihasilkan juga lebih banyak.

Tingginya kadar asam asetat yang dihasilkan secara tidak langsung juga ditunjang oleh pasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 menit. Menurut Schlegel dan Schmidt (1994)

pasteurisasi sudah dapat mematikan sel-sel vegetatif bakteri dan fungi sedangkan spora khamir baru mati di atas 80°C dan untuk spora bakteri baru mati di atas 120°C selama 15 menit. Akibatnya berkurangnya sebagian mikroorganisme. Dengan berkurangnya jumlah sel mikroorganisme ini akan memperkecil kompetisi antar mikroorganisme dalam media limbah fermentasi biji kakao dan menunjang pertumbuhan *Acetobacter aceti*.

Bahkan Dwidjoseputro (1984) mengatakan pasteurisasi juga tidak merusak bahan-bahan nutrisi yang ada sehingga masih dapat digunakan sebagai penunjang metabolisme bakteri. Menurut Schlegel dan Schmidt (1994) nutrisi tidak hanya diperlukan sebagai penyedia bahan-bahan untuk menunjang pertumbuhan mikroorganisme, tetapi yang lebih penting bahwa nutrisi dibutuhkan mikroorganisme sebagai sumber energi untuk menghasilkan ATP. Jika ATP yang dihasilkan tinggi maka kecepatan metabolisme pembentukan produk dan jumlah produk yang dihasilkan juga semakin tinggi, termasuk juga asam asetat.

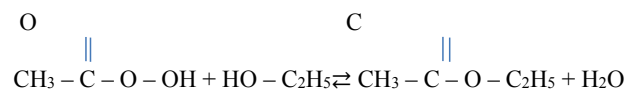
Semakin lama inkubasi maka kadar asam asetat yang dihasilkan semakin rendah. Apabila di dalam media terdapat alkohol yang cukup maka *Acetobacter aceti* akan mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat. Sehingga dapat diperoleh hasil asam asetat yang tinggi. Menurut Desrosier (1977) fermentasi oksidatif terjadi sangat cepat pada kadar alkohol 6-8%.

Tetapi semakin banyak inokulasi starter *Acetobacter aceti* yang ditambahkan ternyata hanya menghasilkan jumlah kadar asam asetat yang sedikit. Hal ini disebabkan karena inokulasi tersebut menyebabkan jumlah sel bakteri asam asetat semakin banyak dalam waktu yang singkat. Padahal nutrisi yang ada dalam media tersebut digunakan secara terus-menerus, apalagi nilai nutrisi yang terkandung pada fermentasi oksidatif lebih sedikit dibandingkan dengan nilai nutrisi pada waktu fermentasi alkoholik. Karena nutrisi yang terdapat dalam media sebagian telah dikonsumsi oleh *Saccharomyces cerevisiae* pada waktu fermentasi alkoholik. Akibatnya jumlah nutrisi semakin berkurang dan akhirnya nutrisi menjadi faktor pembatas sehingga meningkatkan kompetisi untuk mendapatkan nutrisi. Adanya kompetisi dan faktor pembatas nutrisi menyebabkan kematian terhadap sel bakteri yang kalah berkompetisi sehingga jumlah sel bakteri berkurang. Berkurangnya bakteri asam asetat mengakibatkan hanya sebagian kecil alkohol yang dioksidasi menjadi asam asetat, padahal alkohol yang dihasilkan

perlakuan inokulasi 16% *Acetobacter aceti* melalui fermentasi alkoholik lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lain. Sehingga produksi asam asetat juga menurun.

Di samping itu oksidasi lebih lanjut asam asetat menjadi CO₂ dan H₂O untuk memperoleh ATP yang lebih besar dibandingkan dengan ATP yang diperoleh dari oksidasi alkohol menjadi asam asetat menyebabkan asam asetat dalam media menjadi berkurang.

Bahkan Fessenden dan Fessenden (1986) mengatakan adanya asam asetat dan alkohol bersama-sama dalam media menyebabkan terbentuknya senyawa ester. Reaksi terbentuknya senyawa ester dari alkohol dan asam asetat adalah sebagai berikut:



Dengan terbentuknya senyawa ester ini menyebabkan asam asetat dan alkohol dalam media menjadi semakin berkurang.

Sehingga apabila hasil penelitian tersebut dibandingkan dengan standar vinegar oleh *Food Standard Committee* yang menyatakan bahwa vinegar merupakan cairan yang diproduksi oleh bahan baku yang mengandung pati dan gula melalui dua tahap fermentasi yaitu fermentasi alkoholik dan fermentasi oksidatif dan mengandung 4% asam asetat. Sedangkan menurut Haas (1976) vinegar harus mengandung 4-5% asam asetat maka perlakuan inokulasi 13% *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi selama 6 hari sudah memenuhi standar kualitas vinegar karena menghasilkan kadar asam asetat 4,02%. Sedangkan perlakuan yang lainnya belum memenuhi standar vinegar.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Terdapat perbedaan pengaruh konsentrasi *Acetobacter aceti* terhadap kadar asam asetat vinegar dalam media limbah fermentasi biji kakao.
2. Terdapat perbedaan pengaruh waktu inkubasi terhadap kadar asam asetat vinegar dalam media limbah fermentasi biji kakao.
3. Terdapat perbedaan pengaruh konsentrasi *Acetobacter aceti* dan waktu inkubasi terhadap kadar asam asetat vinegar dalam media limbah fermentasi biji kakao.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 1988.*Bercocok Tanam Kakao*. Dinas Perkebunan Daerah Propinsi Daerah Tingkat I Jawa Timur, Jawa Timur.
- Alamsyah, T. S. 1991.*Peranan Fermentasi dalam Pengolahan Biji Kakao Kering*. Pusat Penelitian Jember, Jember.
- Ardhana. 1990.*Microbial Ecology and Biochemistry of Cocoa Bean Fermentation*. Sinauer Ass. INC., Sunderland.
- Crueger, W., C. dan Anneliese. 1984.*Biotechnology: A Text book of Industrial Microbiology*. Sinauer Ass. INC., Sunderland.
- Desrosier, N. W. dan J. N. Desrosier. 1977.*The Technology of Food Preservation*. Fourth Edition. The Avi Publ. Company Inc., Connecticut.
- Frazier, W. C. dan D. C. Westhoff. 1988.*Food Microbiology*. McGraw-Hill Book Company, Singapore.
- Iswanto, H. 1997.*Fermentasi Biji Kakao Menentukan Cita Rasa Coklat Sejati*. Trubus 328-Thn. XXIII-Maret 1997, Jakarta.
- Rahman, A. 1992.*Teknologi Fermentasi*. Penerbit Arcan, Jakarta.
- Sa'id, E. G. 1987.*Bioindustri: Penerapan Teknologi Fermentasi*. Penerbit Pusat Antar Universitas (PAU) Biotek IPB bekerjasama dengan PT Mediyatama Sasana Perkasa, Jakarta.
- Sardjoko. 1991.*Bioteknologi: Latar Belakang dan Penerapannya*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Schlegel, H. G. dan Schmidt. 1994.*Mikrobiologi Umum*. UGM Press, Yogyakarta.
- Tjokroadikoesoemo, P. S. 1993.*HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wibowo, D. 1990.*Teknologi Fermentasi*. Pusat Antar Unoversitas-Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.