

**PENGARUH KONDISI MEDIA FERMENTASI DAN KONSENTRASI
INOKULUM TERHADAP KARATERISTIK SENSORI DAN FISIKO-
KIMIA MINUMAN PROBIOTIK PULPA KAKAO (*Theobroma cacao L.*)
DENGAN LAMA FERMENTASI MENGGUNAKAN KHAMIR
Saccharomyces boulardii SEBAGAI STARTER**

(Skripsi)

Oleh

**MIA KHAFIFAH
1914231001**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRACT

THE EFFECT OF FERMENTATION MEDIA CONDITIONS AND INOCULUM CONCENTRATION ON THE SENSORY AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERISTICS OF COCOA PULPA PROBIOTIC DRINKS (*Theobroma cacao L.*) WITH FERMENTATION TIME USING THE YEAST *Saccharomyces boulardii* AS A STARTER

By

MIA KHAFIFAH

This study aimed to determine the effect of fermentation time, sucrose and inoculum on sensory characteristics of cocoa pulpa probiotic drink with *S. boulardii* as a starter. This study used a three-factor *Response Surface Methodology* (RSM) with 20 experimental units. Three-level independent variable with fermentation time (0, 5, 12.5, 20, and 25 hours), sucrose concentration (1.6%, 2%, 2.5%, 3% and 3.3%) and inoculum (1%, 2%, 3.5% , 5% and 6.0%). Parameters observed were total yeast, total acetic acid, total sugar and hedonic sensory test. The results of the response variables were then analyzed for variance using the *Design Expert 12* program. Analysis of variance was carried out based on the P_{value} of each response, the influential model had a $P_{\text{value}} (<0.05)$. The results showed that the duration of fermentation, sucrose and inoculum had a significant effect on total yeast, total acetic acid and total sugar, while the sensory results of the hedonic test only the interaction between fermentation time and sucrose had an effect on the cocoa pulpa probiotic drink. In the probiotic drink, the best optimization solution was obtained. The effect of the presence of independent variable factors can be seen from the best optimization solution on the prediction of RSM, namely the total response of yeast 7,479 Log CFU/ml, total acid 0.434%, total sugar 10,358%, score aroma and taste 3.975, color 3.453, and overall acceptance of 3.891 with *desirability* value of 0.760.

Keywords: Cocoa pulpa probiotic drink, Fermentation, *Saccharomyces boulardii*, *Response Surface Methodology*.

ABSTRAK

PENGARUH KONDISI MEDIA FERMENTASI DAN KONSENTRASI INOKULUM TERHADAP KARATERISTIK SENSORI DAN FISIKO-KIMIA MINUMAN PROBIOTIK PULPA KAKAO (*Theobroma cacao L.*) DENGAN LAMA FERMENTASI MENGGUNAKAN KHAMIR *Saccharomyces boulardii* SEBAGAI STARTER

Oleh

MIA KHAFIFAH

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi, sukrosa dan inokulum terhadap karakteristik sensori minuman probiotik pulpa kakao dengan penambahan *S. boulardii* sebagai starter. Penelitian ini menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) tiga faktor dengan 20 satuan percobaan. Variabel bebas tiga taraf dengan lama fermentasi (0, 5, 12.5, 20, dan 25 jam), konsentrasi sukrosa (1.6%, 2%, 2.5%, 3% dan 3.3%) dan inokulum (1%, 2%, 3.5%, 5% dan 6.0%). Parameter yang diamati adalah total khamir, total asam asetat, total gula dan uji sensori hedonik. Hasil variable respon selanjutnya dianalisis sidik ragamnya menggunakan program *Desain Expert 12*. Analisis sidik ragam dilakukan berdasarkan nilai P_{value} dari masing-masing respon, model yang berpengaruh memiliki nilai P_{value} ($<0,05$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu lama fermentasi, sukrosa dan inokulum berpengaruh nyata terhadap total khamir, total asam asetat, dan total gula, sedangkan hasil sensori uji hedonik hanya interaksi lama fermentasi dan sukrosa yang berpengaruh pada minuman probiotik pulpa kakao. Pada minuman probiotik didapatkan solusi optimasi terbaik. Pengaruh adanya faktor variable bebas terlihat dari solusi optimasi terbaik pada prediksi RSM dengan respon total khamir 7.479 Log CFU/ml, total asam 0,434%, total gula 10.358%, skor aroma dan rasa 3,975, warna 3,453, serta penerimaan keseluruhan sebesar 3,891 dengan nilai desirability sebesar 0,760.

Kata Kunci: Minuman probiotik pulpa kakao, Fermentasi, *Saccharomyces boulardii*, *Response Surface Methodology*.

**PENGARUH KONDISI MEDIA FERMENTASI DAN KONSENTRASI
INOKULUM TERHADAP KARATERISTIK SENSORI DAN FISIKO-
KIMIA MINUMAN PROBIOTIK PULPA KAKAO (*Theobroma cacao L.*)
DENGAN LAMA FERMENTASI MENGGUNAKAN KHAMIR
Saccharomyces boulardii SEBAGAI STARTER**

Oleh

MIA KHAFIFAH

Skripsi

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

Pada

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



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul : **PENGARUH KONDISI MEDIA
FERMENTASI DAN KONSENTRASI
INOKULUM TERHADAP
KARATERISTIK SENSORI DAN FISIKO-
KIMIA MINUMAN PROBIOTIK PULPA
KAKAO (*Theobroma cacao L.*) DENGAN
LAMA FERMENTASI MENGGUNAKAN
KHAMIR *Saccharomyces boulardii***

Nama Mahasiswa : **Mia Khafifah**

Nomor Pokok Mahasiwa : 1914231001

Program Studi : Teknologi Industri Pertanian

Fakultas : Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing



Prof. Ir. Neti Yuliana, M. Si., Ph.D.
NIP. 196507251992032002



Ir. Fibra Nurainy, M.T.A.
NIP. 196802251996032001

2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian




Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A.
NIP. 197210061998031005

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

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



Sekretaris : Ir. Fibra Nurainy, M.T.A.



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



2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP. 196110201986031002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 20 Juli 2023

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Mia Khafifah

NPM : 1914231001

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

Demikianlah pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 20 Juli 2023
Yang membuat pernyataan.



Mia Khafifah
NPM 1914231001

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 15 Mei 2001 sebagai anak pertama dari tiga bersaudara dari pasangan Bapak Jamal dan Ibu Murhayati. Penulis memiliki dua adik bernama Muzakki Nur Salim dan Hanan At-Taqi. Pendidikan formal yang ditempuh penulis dimulai dari Taman Kanak-kanak di AR-Rusdah 3 Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2007. Lalu melanjutkan sekolah dasar di SD Negeri 3 Penengahan Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2012. Kemudian pendidikan menengah pertama dilanjutkan di SMP Muhammadiyah 3 Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2015, dan melanjutkan pendidikan menengah atas di SMA Muhammadiyah 2 Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2019.

Penulis diterima sebagai mahasiswa Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) pada tahun 2019. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada Januari-Februari 2022 Kecamatan Rajabasa, Kelurahan Gedong Meneng, Kota Bandar Lampung. Penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di PT. Indo American Seafoods, Jl. Ir. Sutami Km. 13, Dusun Kemang, Kab. Lampung Selatan dengan judul “Mempelajari Proses Pengolahan Ebikatsu *Yachiyo* dan Penerapan Keselamatan dan Kesehatan Kerja di PT. Indo American Seafood”.

Penulis juga aktif di organisasi kemahasiswaan Himpunan Mahasiswa Jurusan Teknologi Hasil Pertanian (HMJ THP) FP Unila sebagai Anggota Bidang Pengabdian Masyarakat periode 2020-2021 yang menyelenggarakan berbagai macam kegiatan, terutama kegiatan Kemah Bakti Sosial Mahasiswa (KBSM).

Penulis pernah mengikuti kepanitiaan Pengenalan Kehidupan Kampus bagi Mahasiswa Baru (PKKMB) FP Unila tahun 2019. Selain itu, penulis juga pernah menjadi asisten dosen pada mata kuliah Hortikultura, serta ikut berperan aktif dalam setiap kegiatan yang diselenggarakan pihak jurusan.

SANWACANA

Alhamdulillah rabbil'alamiin, puji syukur penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Pengaruh Kondisi Media Fermentasi dan Konsentrasi Inokulum Terhadap Karakteristik Sensori dan Fisiko-kimia Minuman Probiotik Pulpa Kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan Lama Fermentasi Menggunakan Khamir *Saccharomyces boulardii*”. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini telah mendapatkan banyak arahan, bimbingan, dan nasihat baik secara langsung maupun tidak sehingga penulis pada kesempatan ini mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang memfasilitasi penulis dalam menyelesaikan skripsi.
2. Bapak Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang memfasilitasi penulis dalam menyelesaikan skripsi.
3. Bapak Ir. Harun Al Rasyid, M.T., selaku Ketua Program Studi Teknologi Industri Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung yang Memfasilitasi penulis dalam menyelesaikan skripsi.
4. Ibu Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Pembimbing Pertama atas ketulusan hati, kesabarannya dalam membimbing, motivasi, arahan, bantuan, dan nasehat serta ilmu yang diberikan selama masa studi dan penyusunan skripsi. Terima kasih juga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis dalam proyek penelitian dosen terkait minuman probiotik pulpa kakao.

5. Ibu Ir. Fibra Nurainy, M.T.A., selaku Dosen Pembimbing Kedua, yang telah memberikan banyak bimbingan, arahan, masukan, serta dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Ibu Prof. Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M. Sc., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan saran serta masukan terhadap skripsi penulis.
7. Seluruh Bapak dan Ibu dosen pengajar, staf dan karyawan di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung, yang telah mengajari, membimbing, dan juga membantu penulis dalam menyelesaikan administrasi.
8. Kedua orangtua penulis Bapak Jamal dan Ibu Murhayati, sistem pendukung penulis adikku Muzakki Nur Salim, Hanan At-Taqi yang telah memberikan dukungan spiritual, material, kasih sayang, dan semangat untuk menjalankan perkuliahan, kegiatan kampus, dan kehidupan sehari-hari. Terimakasih karena telah mengajarkan penulis untuk hidup dalam kesederhanaan, kebahagiaan, kedamaian, dan memiliki hati yang ikhlas dan kuat.
9. Sahabat-sahabat penulis Sholeha, Safira, Berti, Ajeng, Indah, Fadia, Saffa, Trya, Zatira, Mba Mentari, Lufita, Meli, Ayu, Yaya, Rifqi dan Abang Luhung yang telah memberikan semangat, motivasi, dan saran kepada penulis.
10. Teman-teman angkatan 2019 Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, adik-adik, kakak-kakak yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.
11. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama masa perkuliahan hingga menyelesaikan skripsi.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang bersifat membangun dan dapat memberikan manfaat bagi penulis serta pembaca.

Bandar Lampung, 20 Juli 2023

Mia Khafifah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.3 Kerangka Pemikiran	5
1.4 Hipotesis	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Buah Kakao (<i>Theobroma cacao L.</i>) dan pulpa kakao	8
2.2 Minuman Probiotik.....	12
2.2.1 Probiotik.....	12
2.2.2 Media Minuman Probiotik	13
2.2.3 Mikroba Pada Minuman Probiotik.....	16
2.3 Fermentasi	19
III. METODOLOGI	22
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
3.2 Alat dan Bahan.....	22
3.3 Metode Penelitian	23
3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	26
3.4.1 Persiapan Starter	26
3.4.1.1 Inokulasi Starter Khamir <i>S.boulardii</i>	26
3.4.1.2 Penentuan Waktu Maksimum Sel.....	27
3.4.1.3 Pembuatan Kultur Kerja Khamir <i>S.boulardii</i>	28
3.4.2 Pengolahan Pulpa Kakao Fermentasi	29
3.4.3 Pembuatan Minuman Probiotik Pulpa Kakao.....	30
3.5 Pengamatan	31

3.5.1 Perhitungan Total Khamir <i>Saccharomycess boulardii</i>	31
3.5.2 Total Asam Asetat (Yuliana <i>et al.</i> , 2023)	32
3.5.3 Pengujian Gula Total	32
3.5.4 Pengujian Sensori	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Total Khamir (<i>Saccharomyces boulardii</i>)	37
4.2 Total Asam Asetat	41
4.3 Total Gula.....	45
4.4 Uji Sensori	49
4.5 Kondisi Optimum	56
V. KESIMPULAN DAN SARAN	58
5.1 Kesimpulan.....	58
5.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi pulpa biji kakao.....	10
2. Komposisi kimia minuman asam laktat	14
3. Standar susu fermentasi dan minuman fermentasi laktat.....	14
4. Hasil desain <i>Respon Surface Methodology</i>	23
5. Faktor, variabel, dan taraf variable RSM secara faktorial 2^3	24
6. Desain percobaan 2^3 faktorial dengan 3 variabel bebas	24
7. Kuisioner uji hedonik kloter pertama.....	34
8. Kuisioner uji hedonik kloter kedua	35
9. Kuisioner uji hedonik kloter ketiga.....	36
10. Hasil respon total khamir	37
11. Hasil respon total asam asetat	41
12. Hasil respon total gula.....	45
13. Hasil respon sensori minuman probiotik pulpa kakao	49
14. Nilai persentase terbaik respon panelis terhadap parameter sensori...	54
15. Data hasil analisa total khamir	69
16. Nilai parameter pemilihan model respon total khamir.....	69
17. Anova model kuadratik respon total khamir.....	70
18. Nilai kesesuaian statistic terhadap total khamir	70
19. Data hasil analisis total asam asetat	70
20. Anova model linear respon total asam asetat.....	71
21. Nilai parameter pemilihan model respon total asam asetat.....	71
22. Nilai kesesuaian statistik terhadap total asam asetat.....	72
23. Data hasil analisis total gula.....	72
24. Anova model 2FI respon total gula.....	73

25.	Nilai parameter pemilihan model respon total gula	73
26.	Nilai kesesuaian statistik terhadap total gula	73
27.	Data hasil analisa sensori	74
28.	Anova model 2FI terhadap aroma dan rasa.....	74
29.	Nilai parameter pemilihan model terhadap aroma dan rasa.....	75
30.	Nilai kesesuaian statistik terhadap aroma dan rasa	75
31.	Anova model 2FI terhadap warna	75
32.	Nilai parameter pemilihan model terhadap warna	76
33.	Nilai kesesuaian statistik terhadap warna	76
34.	Anova model 2FI terhadap penerimaan keseluruhan.....	76
35.	Nilai parameter pemilihan model terhadap penerimaan keseluruhan.	77
36.	Nilai kesesuaian terhadap warna penerimaan keseluruhan.....	77
37.	Solusi optimasi formula minuman probiotik pulpa kakao	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka pemikiran minuman probiotik pulpa kakao.....	5
2. Buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa	9
3. Biji kakao yang diselimuti lendir pulpa	9
4. <i>Saccharomyces boulardii</i>	19
5. Inokulasi starter khamir <i>S.boulardii</i>	27
6. Penentuan waktu maksimum sel	27
7. Pembuatan kultur kerja <i>S.boulardii</i>	29
8. Pengolahan pulpa kakao terfermentasi.....	30
9. Pembuatan minuman probiotik pulpa kakao.....	31
10. Kontur respon (a) dan respon permukaan (b) total khamir	39
11. Kontur respon (a) dan respon permukaan (b) total asam asetat ..	43
12. Kontur respon (a) dan respon permukaan (b) total gula	47
13. Kontur respon (a) dan repon permukaan (b) aroma dan rasa.....	52
14. Kontur respon (a) dan respon permukaan (b) warna.....	52
15. Kontur respon (a) dan permukaan (b) penerimaan keseluruhan ..	53
16. Kombinasi formula optimum minuman probiotik	57
17. Pembuatan media PDA	80
18. Pembuatan media PDB	82
19. Kapsul khamir <i>S.boulardii</i>	83
20. Penginokulasian khamir	83
21. Hasil inokulasi <i>S.boulardii</i>	83
22. Hasil inokulasi stok	83
23. Persiapan cairan pulpa.....	83
24. Penyaringan cairan pulpa kakao.....	83

25.	Cairan pulpa di <i>waterbath</i>	84
26.	Pemasukan cairan pulpa	84
27.	Pemasukkan inokulum	84
28.	<i>Penshakeran</i>	84
29.	Perhitungan total khamir (<i>Hemocytometer</i>)	84
30.	Minuman probiotik pulpa kakao	84
31.	Pengukuran total asam asetat	85
32.	Pengujian total gula	85
33.	Spektrofotometer	85
34.	Pengujian sensori	85

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah salah satu negara penghasil kakao (*Theobroma cacao L.*) terbesar di dunia, yaitu menempati urutan ke-3 setelah 2 negara lainnya yaitu Pantai Gading dan Ghana. Tercatat luas areal perkebunan kakao di negara Indonesia dapat mencapai 1,6 juta hektar dengan jumlah produksi sekitar 593 ribu ton (Mulyatni *et al.*, 2012). Kakao menjadi salah satu komoditas unggulan perkebunan Indonesia yang mempunyai jumlah produksi yang sangat besar. Produksi buah kakao mengalami peningkatan setiap tahunnya yang mengakibatkan semakin meningkatnya jumlah buah kakao yang tidak seluruhnya dimanfaatkan dengan baik sehingga kurangnya diversifikasi produk.

Salah satu hasil samping pengolahan kakao yang dapat dimanfaatkan adalah pulpa kakao. Cairan pulpa kakao mengandung asam asetat atau asam cuka, asam asetat dan alkohol. Asam-asam organik tersebut terbentuk dari fermentasi gula yang terkandung dalam pulpa biji kakao. Pulpa biji kakao adalah selaput berlendir berwarna putih yang membungkus biji kakao, terdapat sekitar 25-30% dari berat biji, diantaranya mengandung gula dengan kadar yang relatif tinggi, sekitar 10-13% (Aridona dkk., 2015). Selama fermentasi dapat dihasilkan cairan pulpa 15-20% dari berat biji kakao yang difermentasi (Aridona dkk., 2015). Potensi cairan pulpa yang cukup besar tersebut selama ini hanya dibuang begitu saja disekitar tempat pengolahan, selain akan mengotori juga dapat berdampak buruk atau mencemari lingkungan disekitarnya. Padahal asam asetat sebagai salah satu kandungan cairan pulpa mempunyai nilai ekonomis yang tinggi, diantaranya dapat digunakan sebagai bahan baku pada produk pangan.

Hal ini disebabkan pulpa kakao telah mengandung mikrobiota indigenous serta nutrisi yang dibutuhkan untuk metabolismenya. Pulpa kakao diketahui mengandung 82-87% air, 10-15% gula (60% sukrosa dan 39% campuran dari fruktosa dan gluosa), 2-3% pentosa, 1-3% asam sitrat dan 1-5% pektin. Selain itu, adanya kandungan protein, asam amino, beberapa vitamin dan mineral menjadikan pulpa kakao sebagai media yang sangat baik untuk pertumbuhan mikroba (Puerari *et al.*, 2012). Sintesis nutrisi yang terdapat pada pulpa oleh mikrobiota alami akan memberikan pengaruh yang sangat penting pada produk kakao akhir (Crafack *et al.*, 2014).

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bila diberikan dalam jumlah yang cukup, akan memberikan manfaat kesehatan pada inangnya (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.*, 2014). Saat ini minuman probiotik menjadi trend bagi kesehatan. Mengonsumsi minuman probiotik tidak hanya untuk mencukupi kebutuhan dasar energi dan gizi, namun minuman fungsional juga dapat memberikan efek kesehatan bagi tubuh dengan memberikan sistem kekebalan tubuh yang disebabkan oleh deplesi nutrisi dan dapat meningkatkan sistem antibodi. Minuman probiotik yang sudah dikenal masyarakat selama ini diproduksi dari hasil fermentasi susu antara lain yogurt, susu asidofilus, bulgarian milk, kefir, dahi dari India, hamao dari Asia Tengah, yakult, dan lain-lain (Pereira, 2018).

Khamir *Saccharomyces boulardii* termasuk salah satu contoh mikroorganisme yang digunakan dalam aplikasi probiotik. Sifat *Saccharomyces boulardii* adalah non-patogen yang bermanfaat banyak untuk kesehatan usus (Sa'adah, 2019). Khamir *Saccharomyces boulardii* termasuk salah satu mikroorganisme yang telah lama dikenal efektif karena memiliki sifat probiotik terutama mengobati gastroenteritis (Dias *et al.*, 2022). Fungsi *Saccharomyces boulardii* dalam saluran usus dapat mencegah kolonisasi patogen di usus (Chan *et al.*, 2022). Manfaat dari mikroorganisme ini diantaranya pengobatan diare, peningkatan sistem kekebalan tubuh dan dapat mencegah infeksi pada saluran kemih dan reproduksi. Khamir *Saccharomyces boulardii* telah terbukti mengurangi durasi diare akut, untuk mencegah diare yang berhubungan dengan antibiotik, dan untuk

membantu radang usus dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri seperti *Escherichia Coli* atau *Clostridium difficile* (Im dan Potholakis, 2010).

Faktor yang mempengaruhi kondisi pertumbuhan khamir *Saccharomyces boulardii* diantaranya lama fermentasi, sukrosa (nutrisi) dan konsentrasi inokulum. Lama fermentasi berpengaruh sangat nyata terhadap starter yang digunakan (Azizah dkk., 2012). Lama fermentasi merupakan variabel yang berkaitan dengan fase pertumbuhan populasi khamir. Lama fermentasi juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan fermentasi. Lama fermentasi merupakan salah satu faktor penting yang perlu diperhatikan pada saat proses fermentasi. Penelitian Yunus dan Zubaidah (2015) menyatakan bahwa waktu inkubasi khamir *Saccharomyces boulardii* yang semakin lama akan memberikan kesempatan kepada khamir untuk memfermentasi gula sebagai energi untuk pertumbuhan.

Faktor nutrisi pada penambahan susu berpengaruh sangat nyata terhadap kadar gula total (Mubin dkk., 2016). Pada proses fermentasi terjadi metabolisme khamir yang menggunakan glukosa sebagai nutrisi pertumbuhannya, glukosa tersebut diubah menjadi asam asetat. Faktor konsentrasi inokulum juga berpengaruh nyata terhadap hasil alkohol. Adanya penambahan konsentrasi inokulum menyebabkan kerja khamir akan semakin cepat untuk mengubah gula menjadi alkohol. Penelitian Wasilu dkk., (2021) menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi sukrosa berpengaruh sangat nyata, serta interaksi keduanya berpengaruh nyata terhadap lama fermentasi water kefir sari buah pepaya.

Beberapa penelitian sebelumnya menggunakan *Saccharomyces boulardii* sebagai starter pada produksi minuman probiotik dengan bahan baku selain susu sapi, seperti produksi bir bebas alkohol (Dias, 2022), minuman kopi yang di fermentasi (Chan *et al.*, 2021), makanan sinbiotik dari ragi probiotik (Chan dan Liu, 2022), dan fermentasi pada produksi bir (Capece *et al.*, 2018). Pembuatan minuman pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii* sebagai starter belum pernah dilakukan penelitian. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh lama fermentasi, penambahan sukrosa dan konsentrasi inokulum terhadap sensori minuman pulpa kakao dengan penambahan *Saccharomyces*

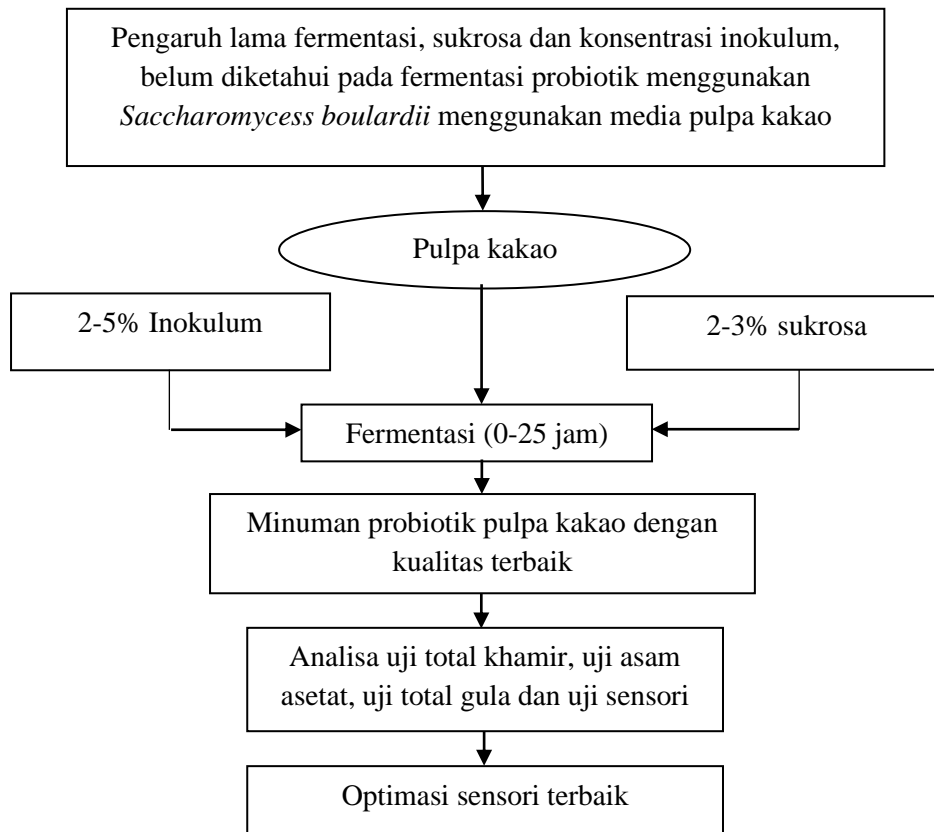
boulardii sebagai starter. Penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan minuman probiotik pulpa kakao dengan karakteristik minuman fermentasi probiotik terbaik melalui optimasi kondisi proses fermentasi (lama fermentasi, sukrosa dan inokulum).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh lama fermentasi, sukrosa dan inokulum terhadap karakteristik sensori dan fisiko-kimia minuman pulpa kakao dengan penambahan *Saccharomyces boulardii* sebagai starter.
2. Mengetahui pengaruh interaksi lama fermentasi, konsentrasi sukrosa dan konsentrasi inokulum yang menghasilkan karakteristik sensori terbaik minuman probiotik pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii*.

1.3 Kerangka Pemikiran



Gambar 1. Kerangka pemikiran fermentasi pulpa kakao dengan menggunakan *S. boulardii* pada pembuatan minuman probiotik.

Pulpa merupakan lapisan lendir dari biji kakao terdiri atas air (80–90%), gula (10–15%), asam sitrat (0,4–0,8%), pektin (1%) serta komponen lainnya. Pulpa sebagian besar terdiri dari air dan sebagian kecil berupa senyawa nutrisi yang terlarut, diantaranya gula dengan kandungan cukup tinggi, asam-asam karboksilat, protein, vitamin dan mineral sehingga baik untuk pertumbuhan mikroorganisme. Pulpa kakao berpotensi untuk dijadikan bahan dasar alternatif dalam memproduksi minuman fermentasi. Salah satu bentuk diversifikasi olahan pulpa kakao yang difermentasi adalah minuman probiotik dengan memanfaatkan *S. boulardii*. Mikroba ini merupakan khamir probiotik yang dapat merangsang kekebalan tubuh dan banyak digunakan untuk mengobati gangguan pencernaan, seperti diare. Studi eksperimental telah menunjukkan bahwa *Saccharomyces boulardii* memiliki sifat probiotik spesifik yang melibatkan dampak pada adhesi patogen enterik, faktor

imun mukosa, pensinyalan sel inang, dan mediator proses inflamasi (Sa'adah, 2018).

Faktor yang mempengaruhi fermentasi antara lain lama fermentasi, gula (nutrisi), dan konsentrasi inokulum (Afrianti, 2013). Lama fermentasi berpengaruh terhadap jumlah pertumbuhan mikroba (Azizah dkk., 2012). Lama fermentasi juga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan fermentasi. Keberadaan oksigen juga akan mengoksidasi etanol menjadi asam asetat sehingga pH medium akan menurun (Hawusiwa, Wardani, & Ningtyas, 2015). Hal ini juga sesuai dengan pendapat Anwar *et al.* (2012) bahwa inhibitor agent pada pertumbuhan khamir diantaranya adalah waktu fermentasi yang terlalu lama atau terlalu alkalis dan juga konsentrasi gas CO₂ yang terlalu tinggi akan menyebabkan pertumbuhan khamir menjadi kurang maksimal dikarenakan khamir termasuk dalam jenis mikroba aerob yang kebutuhan oksigen menjadi penyokong kehidupan khamir. Selain terhadap pertumbuhan mikroba, lama fermentasi berpengaruh terhadap metabolit fermentasi. Menurut Lengkey dan Balia (2014) total asam pada kefir akan meningkat seiring dengan bertambahnya waktu lama fermentasi sehingga kefir dengan lama fermentasi paling panjang akan menghasilkan total asam tertinggi atau terbanyak.

Faktor nutrisi berpengaruh sangat nyata terhadap proses fermentasi yang perubahannya dapat dilihat pada kadar total gula (Mubin dkk., 2016). Senyawa gula merupakan sumber nutrisi atau karbon yang digunakan sebagai energi bagi aktivitas katabolis *Saccharomyces cerevisiae*. Konsentrasi sukrosa yang berlebihan dapat membuat sel khamir mengalami plasmolisis (pengkerutan sel) karena adanya lingkungan berubah menjadi hipertonic dan akhirnya mati (Insani *et al.*, 2018). Penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa penambahan sukrosa sebanyak 0%, 3%, 6%, 9% dan 12% terhadap pembuatan water kefir sari buah naga memberi pengaruh nyata terhadap kualitas mikrobiologi, kimia dan mutu hedoniknya (Insani *et al.*, 2018).

Konsentrasi inokulum berpengaruh terhadap hasil metabolit, makin banyak inokulum yang ditambahkan semakin besar metabolit yang dihasilkan. Fermentasi dengan penambahan konsentrasi inokulum yang tinggi akan mempercepat perombakan gula menjadi metabolit. Penelitian Yan dan Kim (2011), menyatakan bahwa pembuatan anggur fermentasi dengan penambahan 2% inokulum menghasilkan hasil terbaik. Peningkatan konsentrasi inokulum berpengaruh positif terhadap laju produksi asam asetat (Niamah, 2017). Hal ini diduga karena adanya persaingan antar khamir dalam mendapatkan nutrisi untuk pertumbuhannya, serta dipengaruhi oleh banyaknya asam yang terbentuk selama fermentasi yang dapat menghambat pertumbuhan khamir (Niamah, 2017).

Berdasarkan uraian hasil beberapa penelitian yang telah dilakukan terlihat bahwa lama fermentasi dan gula berpengaruh sangat nyata terhadap karakteristik sensori dan kimia minuman probiotik. Konsentrasi sukrosa diduga berpengaruh nyata terhadap minuman probiotik pulpa kakao karena menyamarkan rasa dan aroma kakao. Penambahan inokulum yang tepat dapat menghasilkan karakteristik fermentasi terbaik serta berpengaruh terhadap karakteristik sensori minuman probiotik pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii*. Untuk mengoptimasi hasil fermentasi sebagai akibat pengaruh adanya lama fermentasi, sukrosa dan inokulum maka penelitian ini menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). Pada metode ini dilakukan analisa pengamatan pada semua perlakuan dan pengaruh interaksinya berdasarkan respon yang diinginkan serta pengamatan mengenai sensori terbaik pada karakteristik minuman probiotik pulpa kakao.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Lama fermentasi, penambahan sukrosa dan konsentrasi inokulum *Saccharomyces boulardii* berpengaruh nyata terhadap karakteristik pulpa kakao.
2. Interaksi lama fermentasi, sukrosa dan inokulum yang optimal menggunakan *Saccharomyces boulardii* menghasilkan karakteristik terbaik minuman probiotik pulpa kakao

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) dan Pulpa Kakao

Tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) adalah salah satu tanaman perkebunan yang dikembangkan dalam rangka peningkatan sumber devisa negara dari sektor non migas. Tanaman kakao merupakan salah satu anggota genus *Theobroma* dari familia *Sterculiaceae* ini banyak dibudidayakan karena memiliki nilai ekonomis dari buah dan bijinya. Secara botani, sistematika tanaman kakao adalah sebagai berikut.

Divisio : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Malvales
Familia : Sterculiaceae
Genus : *Theobroma*
Spesies : *Theobroma cacao L.*

Sejak fase pembuahan sampai menjadi buah dan matang, kakao memerlukan waktu sekitar 5 bulan. Buah matang dicirikan oleh perubahan warna kulit buah dan biji yang lepas dari kulit bagian dalam. Bila buah diguncang, biji biasanya berbunyi. Keterlambatan waktu panen akan berakibat pada berkecambahnya biji di dalam. Murugan dan Al-Sohaibani (2012), buah kakao yang masak berisi sekitar 30-40 biji yang terbungkus oleh lapisan lendir seperti yang terlihat pada Gambar 2. Buah kakao terdiri atas 4 bagian, yaitu kulit, plasenta, pulpa serta biji. Biji terdiri atas 2 bagian, yaitu kulit biji (testa) dan keping biji. Keping biji merupakan bagian terbesar dari biji yaitu 86-90%, sisanya merupakan kulit biji mencapai 10-14%. Pulpa merupakan lapisan lendir dari biji kakao terdiri atas 80-

90% air, dan gula 4- 8%. Komposisi pulpa yang demikian merupakan media pertumbuhan yang baik bagi mikroorganismenya.



Gambar 2. Buah kakao dengan biji yang diselimuti pulpa
Sumber: (Rachmatullah dkk., 2021).

Pulpa adalah lapisan lendir berwarna putih atau kuning pucat yang menyelimuti permukaan biji kakao (Gambar 3). Pulpa merupakan lapisan tebal endosperm yang terdiri dari sel-sel turbuler dengan ruang antar sel yang besar (Murugan dan Al-Sohaibani, 2012). Pada buah yang mentah lapisan ini membengkak, akan tetapi pada buah yang masak lapisan ini menjadi lunak dan berlendir. Pulpa tersebut menempati porsi 40% dari berat basah biji kakao, dan dapat bervariasi tergantung pada varietas, lokasi tempat tumbuh, musim ketika panen dan tingkat kematangan buah. Pulpa merupakan jaringan halus berlendir yang melekat ketat pada biji kakao. Pulpa sebagian besar terdiri dari air dan sebagian kecil berupa senyawa nutrisi yang terlarut, diantaranya gula dengan kandungan cukup tinggi, asam-asam karboksilat, protein, vitamin dan mineral.



Gambar 3. Biji kakao yang diselimuti lendir pulpa
Sumber: (Rachmatullah dkk., 2021).

Pengolahan kakao mempunyai hasil sampingan, yang belum diperhatikan oleh masyarakat dan cenderung dianggap sebagai sampah atau limbah. Salah satu hasil sampingan yang diperoleh dari proses pengolahan awal kakao adalah pulpa. Pulpa merupakan lapisan berwarna putih yang melapisi permukaan biji kakao. Proses pemanfaatan pulpa kakao belum banyak diketahui oleh masyarakat secara umum, sehingga sering terjadi permasalahan limbah pada saat proses pengolahan awal kakao. Pengaplikasian pulpa kakao pada non pangan yaitu terlihat pada penelitian Nurhidayah, (2018) mengenai pemanfaatan Isolat Bakteri dari Cairan Pulpa Kakao sebagai Bioaktivator dalam Pengomposan Limbah Kulit Buah Kakao, sedangkan pengaplikasian pulpa kakao pada pangan terlihat pada penelitian Wibowo, (2023) mengenai pembuatan kombucha dan penelitian Ninda, (2022) mengenai Sensori Kombucha Pulpa Kakao dan Pendugaan Harga Pokok Produksi: Efek Penambahan Jahe (*Zingiber officinale*).

Buah kakao dipetik atau dipanen setelah masak optimal. Setelah 143 hari buah mengalami proses pemasakan dan masak optimal setelah berumur 170 hari, ditandai dengan perubahan warna kulit buah kakao sesuai dengan varietasnya. Buah kakao yang masak berisi sekitar 30-40 biji yang terbungkus oleh lapisan lender (pulp). Berat biji kakao yang diperoleh dipengaruhi oleh curah hujan selama periode pemasakan buah. Pulp merupakan senyawa yang sebagian besar terdiri atas air. Komposisi pulp disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Pulp Biji Kakao

Komponen	Kandungan Rata-rata (%)
Air	80-90
Albuminoid, Astringents dsb	0,5-0,7
Glukosa	8-13
Sukrosa	0,4-1,0
Pati	-
Asam non-volatil	0,2-0,4
Besi oksida	0,03
Garam-garam	0,4-0,45
Asam-asam menguap	-
Alkohol	-

Sumber: Haryadi dan Supriyanto (1991).

Pada proses fermentasi kakao akan terjadi perombakan gula dan asam sitrat dalam pulpa menjadi asam-asam organik yang dilakukan oleh konsorsium mikrobia pelaku fermentasi. Fermentasi biji kakao pada dasarnya mempunyai dua tujuan, yaitu untuk menghancurkan lapisan berlendir yang menyelimuti keping biji (pulpa), dan mengusahakan kondisi untuk terjadinya reaksi dalam keping biji selama proses fermentasi. Asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi akan menginduksi reaksi enzimatik yang ada di dalam pulpa sehingga terjadi perubahan biokimia yang akan membentuk senyawa yang memberi aroma, rasa, dan warna pada kakao (Widianto dkk., 2013). Proses ini dilakukan dengan cara memeram biji kakao pada wadah tertutup selama 5-7 hari agar dihasilkannya cairan pulpa kakao.

Kandungan air selama fermentasi digunakan dalam reaksi enzimatik dalam biji dan pertumbuhan mikrobia di dalam pulpa. Air akan mempertemukan enzim dengan substrat yang pada pulpa sehingga proses hidrolisis dan oksidasi senyawa rasa, warna, dan aroma pada kakao dapat terjadi. Kandungan air yang dibutuhkan dalam fermentasi kakao adalah lebih dari 35%. Substrat adalah bahan yang dirombak oleh mikrobia selama proses fermentasi. Substrat dalam fermentasi biji kakao adalah gula dan asam sitrat yang terkandung dalam pulpa. Selama proses fermentasi pulpa akan dirombak oleh mikrobia menjadi asam-asam organik. Keberadaan asam sitrat membuat lingkungan di sekitar pulpa menjadi asam sehingga akan menginisiasi pertumbuhan ragi dan terjadi fermentasi secara anaerob. Selama proses fermentasi terjadi pula aktivitas enzimatik, enzim yang terlibat adalah endoprotease, aminopeptidase, karboksipeptidase, invertase (kotiledon dan pulpa), polifenol oksidase dan glikosidase. Enzim-enzim ini berperan dalam pembentukan prekursor cita rasa dan degradasi pigmen selama fermentasi (Widianto dkk., 2013).

Proses yang terjadi selama dilakukan fermentasi pada biji kakao yaitu fermentasi eksternal dan fermentasi internal. Fermentasi eksternal adalah fermentasi yang terjadi di luar keping biji kakao dan bertujuan untuk menghilangkan pulpa dan meniadakan daya hidup dari biji. Sedangkan fermentasi internal adalah fermentasi yang terjadi dalam keping biji kakao dan bertujuan untuk pembentukan calon

pembentukan calon (flavor) warna, rasa, aroma, serta menghilangkan rasa pahit. Fermentasi kakao yang telah selesai biasanya ditandai atau dapat diketahui, antara lain pulpa mudah dibersihkan dari kulit biji, kulit biji berwarna coklat, dan bau asam cuka sangat jelas.

2.2 Minuman Probiotik

Minuman probiotik adalah jenis minuman yang mengandung mikroorganisme hidup yang umumnya menggunakan bakteri asam asetat, yang apabila dikonsumsi dalam jumlah cukup dapat memberikan manfaat kesehatan terhadap inangnya dan bersifat strain spesifik (FAO/WHO, 2001). Minuman probiotik merupakan salah satu contoh makanan fungsional. Saat ini banyak dikembangkan pembuatan minuman probiotik dari sari buah yang bersifat rendah lemak dan mengandung serat pangan yang bermanfaat bagi sistem pencernaan. Minuman probiotik umumnya mengandung bakteri seperti bakteri asam asetat (BAL) yang menguntungkan bagi saluran pencernaan karena dapat meningkatkan keseimbangan mikroflora usus dan mampu bertahan hidup dalam keasaman lambung sehingga dapat menempati usus dalam kuantitas yang cukup besar (Utami, 2018).

2.2.1 Probiotik

Probiotik adalah bakteri hidup baik yang membantu nutrisi di saluran gastrointestinal dan memberikan pertahanan untuk melawan bakteri patogen. Fungsi probiotik adalah sebagai pertahanan mukosa, fungsi proteksi dan pertahanan imunitas saluran cerna seperti misalnya lapisan epitel, lapisan mukus, peristaltik, dan deskuamasi epitel, serta sekresi immunoglobulin A (IgA), sangat berpengaruh terhadap perlekatan kuman patogen dan juga untuk modulasi sistem imun lokal dan sistemik. Probiotik yang efektif harus memenuhi kriteria yaitu memberikan efek yang menguntungkan bagi host yaitu mengandung sejumlah sel besar hidup yang mampu bertahan dan melakukan metabolisme dalam usus halus manusia yang memberikan efek positif bagi kehidupan mikroflora di usus halus, probiotik juga harus mampu menempel pada sel epitel usus manusia, mampu

membentuk kolonisasi pada saluran pencernaan, dan mampu menghasilkan zat anti mikroba (bakteriosin) (Chan *et al.*, 2022).

Syarat utama strain yang dapat digunakan sebagai agensia probiotik adalah memiliki resistensi terhadap asam dan empedu sehingga dapat mencapai intestin dan memiliki kemampuan menempel pada mukosa intestin (Allen *et al.* 2011). Syarat lain yang perlu dimiliki oleh bakteri probiotik adalah kemampuannya menghasilkan substansi antimikrobia sehingga mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen enterik. Berbagai jenis substansi antimikrobia yang dihasilkan oleh bakteri probiotik adalah asam organik, hidrogen peroksida, diasetil dan diperkirakan juga bakteriosin yaitu protein atau polipeptida yang memiliki sifat anti bakteri (Allen *et al.* 2011). Syarat lain yaitu mikrobia probiotik adalah tumbuh baik secara *in vitro*, memiliki stabilitas dan viabilitas yang tinggi dan aman bagi manusia serta tidak bersifat patogen dan aman jika di konsumsi. Strain probiotik juga harus tahan dan tetap hidup selama proses pengolahan makanan dan penyimpanan, mudah diaplikasikan pada produk makanan, tahan terhadap proses psikokimia pada makanan, mempunyai sensori yang baik dan tidak meningkatkan angka keasaman selama penyimpanan (Allen *et al.* 2011).

2.2.2 Media Minuman Probiotik

Minuman probiotik yang sudah dikenal masyarakat selama ini diproduksi dari hasil fermentasi susu antara lain yogurt, susu asidofilus, bulgarian milk, kefir, dahi dari India, hamao dari Asia Tengah, yakult, dan lain-lain (Pereira, 2018). Minuman probiotik tersebut harganya relatif mahal maka banyak dikembangkan minuman probiotik berbahan baku non-susu seperti buah-buahan, biji-bijian, dan kacang-kacangan. Minuman probiotik tersebut dibuat dengan mencampurkan beberapa bahan lain dengan memanfaatkan teknik dasar seperti pada susu fermentasi (Otle, 2013). Karakteristik hasil fermentasi tersebut ditentukan oleh mutu dan sifat-sifat bahan itu sendiri. Menurut standar makanan Jepang komposisi kimia minuman probiotik atau dikenal sebagai minuman asam laktat per 100 g dapat dilihat sebagai berikut.

Tabel 2. Komposisi Kimia Minuman Asam Laktat (per 100 g)

Komposisi	Penambahan SNF $\geq 3\%$	Penambahan SNF $< 3\%$
Energi Kal	69,00	56,00
KJ	289,00	234,00
Air (g)	82,10	85,40
Protein (g)	1,10	0,40
Lemak (g)	0,10	0,00
Gula (g)		
Laktosa	1,90	0,70
Gula lain	14,50	13,30
Abu (g)	0,30	0,20
Mineral		
Ca (mg)	43,00	17,00
P (mg)	30,00	12,00
Fe (mg)	0,00	0,00
Na (mg)	18,00	19,00
K (mg)	48,00	32,00
Vitamin		
A (UI)	0,00	0,00
B1 (mg)	0,01	0,00
B2 (mg)	0,05	0,00
Niacin (mg)	0,00	0,00
C (mg)	0,00	0,00

Keterangan : SNF = *Solid Non Fat*

Sumber : Nakazawa dan Hosono (1992)

Sedangkan standar mutu minuman susu fermentasi dan minuman fermentasi laktat seperti ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Standar Susu Fermentasi dan Minuman Fermentasi Laktat

Kategori	Tipe	Definisi	Standar		
			SNF	BAL atau Khamir	Koliform
Produk Susu	Susu minuman fermentasi	Susu yang ditambahkan SNF yang difermentasi oleh BAL	$\geq 8,0$	$\geq 1 \times 10^7 / \text{mL}$	Negatif
Produk susu	Minuman fermentasi	Minuman yang diproses dari susu yang difermentasi oleh BAL atau khamir	$\geq 3,0$	$\geq 1 \times 10^7 / \text{mL}$	Negatif
Berbahan dasar susu	Minuman fermentasi	Minuman yang diproses dari susu yang difermentasi oleh BAL atau khamir	$\geq 3,0$	$\geq 1 \times 10^7 / \text{mL}$	Negatif

Sumber : Benninga (1990).

Produk probiotik untuk dapat memberikan manfaat optimal bagi inangnya harus memiliki jumlah sel hidup 10^7 sampai 10^9 koloni/mL dan total konsumsi produk probiotik sekitar 300 sampai 400 g/minggu (Adib, 2015). Efek probiotik dapat dipertahankan jika makanan pembawa mengandung minimal organisme probiotik 10^6 sampai 10^8 koloni/mL atau 10^8 sampai 10^{10} koloni/g (preparat kering). Konsumsi probiotik sebaiknya teratur karena waktu kolonisasi dari mikroorganisme probiotik bersifat terbatas, serta terdapat kompetisi dengan mikroorganisme intestinal patogen.

Salah satu produk pangan fungsional yang banyak dikonsumsi adalah minuman probiotik. Salah satunya adalah Kombucha. Kombucha merupakan minuman kesehatan yang sangat menyegarkan yang dibuat dengan fermentasi serbuk teh dengan *Scoby* (*symbiotic consortium of bacteria and yeast*) terutama spesi bakteri yang bersifat asam. Berbagai jenis khamir (seperti: spesies *Pichia*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces* dan *Saccharomyces*) dan bakteri *Acetobacter xylinum* telah berhasil diidentifikasi dalam fermentasi Kombucha (Jayabalan *et al.*, 2014). Proses pembuatan minuman ini memiliki berbagai keuntungan diantaranya sebagai antioksidan, antikanker, antidiabetes dan pada pencernaan manusia (Candra, 2020).

Pembuatan produk probiotik dari minuman sari buah kakao dapat menggunakan khamir (*Sacharomyces boulardii*) sebagai agen probiotik. Pemilihan khamir menjadi faktor penting dalam keberhasilan pembuatan minuman probiotik dari buah kakao. Peranan *Saccharomyces boulardii* sebagai agen probiotik sangat ditentukan oleh sifatnya yaitu tetap dalam keadaan hidup sejak dikonsumsi hingga mencapai usus manusia. Fungsi *Saccharomyces boulardii* dalam saluran usus karena dapat mencegah kolonisasi patogen di usus (Chan *et al.*, 2022). Manfaat dari mikroorganisme ini diantaranya pengobatan diare, peningkatan sistem kekebalan tubuh dan dapat mencegah infeksi pada saluran kemih dan reproduksi. Khamir *Saccharomyces boulardii* telah terbukti mengurangi durasi diare akut, untuk mencegah diare yang berhubungan dengan antibiotik, dan untuk membantu radang usus dan infeksi yang disebabkan oleh bakteri seperti *Escherichia Coli* atau *Clostridium difficile* (Im dan Potholakis, 2010).

2.2.3 Mikroba Pada Minuman Probiotik

Peranan bakteri asam laktat sebagai agen probiotik sangat ditentukan oleh sifatnya yaitu tetap dalam keadaan hidup sejak dikonsumsi hingga mencapai usus manusia. Pada umumnya bakteri asam laktat yang berasal dari saluran pencernaan manusia seperti *Lactobacillus* dan *bifidobakteria* yang merupakan penghuni alami jalur intestine yang banyak digunakan sebagai agensia probiotik. Bakteri ini ditemukan pada membran mukosa. Uji secara *in vitro* diketahui bahwa *Lactobacillus* mampu menghambat berbagai jenis bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Shigella* dan *Staphylococcus*. *Lactobacillus* mampu menghasilkan komponen antimikroba antimikroba yang disebut misalnya asidolin, asidofilin maupun laktosidin yang diperkirakan memiliki spektrum luas baik terhadap bakteri gram positif maupun negative. Bakteri probiotik dapat memberikan berbagai efek positif terhadap kesehatan melalui berbagai mekanisme. Efek yang paling utama adalah menjaga keseimbangan mikroflora pada intestin dan memiliki efek anti diare akibat patogen enterik. Mekanisme probiotik di dalam mikroflora yang seimbang adalah melalui kompetisi nutrisi, kompetisi reseptor untuk penempelan pada sel epitel, produksi anti mikrobia, dan stimulasi imunitas pada ekosistem endogenus (Chan *et al.*, 2022).

(1) Probiotik Bakteri Asam Laktat

Beberapa probiotik umum meliputi berbagai spesies dari genera *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus* seperti: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus GG*. Ada pula satu spesies ragi yang digunakan sebagai probiotik: *Saccharomyces boulardii*. Beberapa bakteri yang umum dipakai dalam produk tapi tanpa efek probiotik (bakteri yoghurt): *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, Beberapa bakteri lain disebutkan dalam produk probiotik: *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus caucasicus*. Beberapa produk fermentasi mengandung asam laktat bakteri yang mirip walaupun sering belum dibuktikan memiliki efek probiotik atau kesehatan termasuk: Kefir, Yoghurt, Sauerkraut, Kimchi, Kombucha (Yuniastuti, 2015).

Produk yang dikatakan sebagai probiotik harus mengandung bakteri probiotik dengan jumlah minimal 10^7 CFU/ml. Bakteri tersebut harus tahan terhadap pengolahan, tahan terhadap garam empedu, mampu melewati asam lambung dengan pH berkisar 3-5, dan mampu bertahan hidup di dalam saluran pencernaan sehingga dapat memberikan efek kesehatan yang baik bagi tubuh (Retnowati dan Kusnadi, 2014).

(2) Probiotik Khamir *Saccharomyces boulardii*

Saccharomyces boulardii adalah ragi yang ditemukan dalam probiotik dan membantu melawan diare dan masalah pencernaan lainnya. Beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan *Saccharomyces boulardii* sebagai starter pada produksi minuman probiotik dengan bahan baku selain susu sapi, seperti produksi bir bebas alkohol (Dias, 2022), minuman kopi yang di fermentasi (Chan *et al.*, 2021), makanan sinbiotik dari ragi probiotik (Chan dan Liu, 2022), dan fermentasi pada produksi bir (Capece *et al.*, 2018). Pembuatan minuman pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii* sebagai starter belum pernah dilakukan penelitian terdahulu sehingga digunakanlah penambahan *Saccharomyces boulardii* pada minuman probiotik pulpa kakao sebagai starter.

Saccharomyces boulardii merupakan khamir probiotik yang tahan terhadap pH rendah dan sangat toleran terhadap asam empedu. Kisaran pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* adalah pada pH 5,5 dengan suhu pertumbuhan optimalnya adalah sekitar 37°C (Dias, 2022). Probiotik membantu mengirim makanan melalui usus dengan memengaruhi saraf yang mengontrol pergerakan usus. Beberapa kondisi yang bisa ditangani dengan mengonsumsi probiotik, yaitu sindrom iritasi usus, penyakit radang usus, diare yang disebabkan oleh antibiotik, dan kesehatan saluran kemih (Dias, 2022). *Saccharomyces boulardii* adalah sejenis ragi yang bersumber dari kulit tumbuhan seperti leci dan manggis.

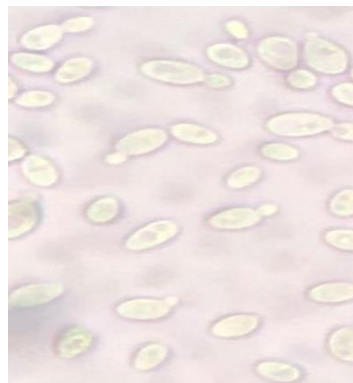
Saccharomyces boulardii juga digunakan untuk mengobati gangguan pencernaan karena dapat merangsang kekebalan tubuh. Menurut data kesehatan yang dipublikasikan oleh *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *Saccharomyces boulardii* dapat membantu mengobati kolitis ulserativa dan diare

akut pada bayi. Aplikasi klinis dalam beberapa tahun terakhir telah mendapat perhatian lebih karena sifat menguntungkan termasuk regulasi kekebalan usus dan perlindungan penghalang usus. *Saccharomyces boulardii* banyak digunakan untuk mengobati gangguan pencernaan, seperti diare. Studi eksperimental telah menunjukkan bahwa *Saccharomyces boulardii* memiliki sifat probiotik spesifik yang melibatkan dampak pada adhesi patogen enterik, faktor imun mukosa, pensinyalan sel inang, dan mediator proses inflamasi (Sa'adah, 2018).

Saccharomyces boulardii adalah salah satu probiotik yang paling efektif untuk membantu mencegah atau mengobati penyakit. Klasifikasi dari *S. boulardii* yaitu Filum Ascomycota, Subfilum Saccharomycotina, Kelas Saccharomycetes, Ordo Saccharomycetales, Famili Saccharomycetaceae, Genus Saccharomyces, Spesies *Saccharomyces boulardii*. Sifat *S. boulardii* adalah non-patogen yang bermanfaat banyak dalam saluran usus. *S. boulardii* terisolasi dari kulit leci dan buah manggis yang tumbuh di kawasan Indochina. *S. boulardii* tersebut memiliki taksonomi, fisiologi, metabolik dan karakter genetik yang khas.

Saccharomyces boulardii merupakan salah satu khamir yang memenuhi kriteria probiotik. Suatu produk dikatakan probiotik apabila mengandung bakteri probiotik dengan jumlah minimal 10^7 CFU/ml, dapat memberikan kesehatan bagi tubuh, kemampuan untuk tumbuh dan berkoloni di usus sehingga dapat mendukung gut microbiota, serta manfaat kesehatan lainnya (Pusat study pangan dan gizi UGM, 2022). *S. boulardii* tumbuh pada daerah dengan suhu 37°C . Khamir jenis ini telah banyak digunakan di seluruh dunia sebagai suplemen probiotik untuk mendukung kesehatan gastrointestinal dengan meningkatkan populasi bifidobacteria usus sehat sekaligus mengurangi jumlah organisme yang dapat menyebabkan penyakit. *S. boulardii* bekerja dalam berbagai cara di dalam usus, tergantung pada jenis agen infeksi atau proses inflamasi yang menstimulasi sel usus. Pada beberapa kasus infeksi diare, khamir ini akan berkompetisi dengan organisme yang menginfeksi dan khamir ini menang (Sa'adah, 2018).

Studi eksperimen memperlihatkan hasil bahwa *Saccharomyces boulardii* mempunyai sifat anti mikroba, sama baiknya dengan anti inflamasi dan anti racun. Mekanisme yang paling berpengaruh dari *Saccharomyces boulardii* adalah dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang mengandung racun, anti-inflammatory dan banyaknya efek stimulatory pada mukosa usus (Chan dan Liu, 2022). *Saccharomyces boulardii* menginaktivasi racun bakteri, menghambat racun yang mengikat pada reseptor usus dan mengurangi toksin yang disebabkan peradangan. *Saccharomyces boulardii* tidak melakukan reproduksi spora atau yang disebut askospora dan tidak menggunakan gula galaktosa. Hal ini yang menyebabkan menjadi sangat tahan terhadap panas dan asam. *S. boulardii* adalah uniseluler (bersel satu) dan berbentuk globuler, bereproduksi dengan tunas yang akan meninggalkan luka pada permukaannya ketika tunas tersebut keluar (Gambar 4).



Gambar 4. *Saccharomyces boulardii*

2.3 Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suryani, 2017). Mikroba yang umumnya terlibat dalam fermentasi pangan adalah bakteri, khamir dan kapang. Percepatan fermentasi dan pertumbuhan mikroorganisme memerlukan nutrisi tambahan. Selain memerlukan karbohidrat, juga membutuhkan nitrogen dan mineral yang cukup untuk dapat tumbuh dan produksi dengan optimal. Prinsip dasar fermentasi adalah mengaktifkan aktivitas mikroba tertentu agar dapat merubah sifat bahan sehingga dihasilkan produk fermentasi yang bermanfaat. Beberapa faktor yang mempengaruhi fermentasi

antara lain mikroorganisme, substrat (medium), pH (keasaman), suhu, oksigen, dan aktivitas air (Afrianti, 2013). Selain zat gizi, suhu, air, pH dan oksigen, fermentasi juga dipengaruhi oleh waktu. Waktu fermentasi merupakan variabel yang berkaitan dengan fase pertumbuhan mikroba selama proses fermentasi berlangsung sehingga akan berpengaruh terhadap hasil fermentasi.

Inokulum merupakan mikroorganisme yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi. Inokulum memiliki peran yang paling penting dalam menunjang keberhasilan proses fermentasi. Penggunaan starter berlebihan akan menghasilkan asam laktat yang berlebihan sehingga rasa yang dihasilkan sangat asam, namun penggunaan kultur terlalu sedikit akan menghasilkan rasa dan aroma kurang lezat serta tidak terjadi pengumpalan (Febriana dan Prima, 2020). Proses fermentasi dapat berlangsung dengan baik dengan adanya inokulum sebagai starter dan media fermentasi yang akan menyediakan nutrient yang dibutuhkan oleh BAL untuk pertumbuhan, bahan pembentuk sel, dan biosintesis produk metabolisme. Penggunaan konsentrasi yang tepat sangat diperlukan dalam pembentukan tekstur dan flavour.

Salah satu faktor yang mempengaruhi kualitas minuman probiotik yaitu substrat yang digunakan sebagai media fermentasi, mikroba membutuhkan substrat untuk kehidupannya, yaitu sebagai sumber karbon dan sumber energi. Selama proses fermentasi, bakteri asam laktat merombak gula melalui sistem metabolismenya sehingga menghasilkan energi untuk melakukan pertumbuhan. Gula pada media pertumbuhan akan dimanfaatkan bakteri asam laktat sebagai sumber karbon untuk aktivitas kerjanya, sehingga semakin lama fermentasi jumlah gula akan semakin menurun (Kusuma dkk., 2020). Bakteri asam laktat umumnya mendapatkan energi dari glukosa, tetapi beberapa spesies juga menggunakan gula-gula seperti laktosa, sukrosa dan xilosa. Salah satu bahan yang dapat digunakan sebagai bahan tambahan substrat pembuatan minuman probiotik adalah pulpa kakao. Kandungan serat yang berfungsi sebagai komponen non gizi juga bermanfaat bagi keseimbangan flora usus, merangsang pertumbuhan bakteri yang baik bagi usus sehingga penyerapan zat gizi menjadi lebih baik dan usus lebih bersih.

Penurunan pH pada substrat juga dapat mengakibatkan terjadinya kenaikan viskositas suatu bahan karena adanya proses hidrolisis protopektin menjadi gel oleh molekul pektin. Pada pH rendah, pektin akan semakin banyak sehingga gesekan antar partikel semakin tinggi dan mengakibatkan viskositas larutan menjadi semakin meningkat. Penurunan pH pada substrat ini diakibatkan oleh adanya aktivitas BAL yang menghasilkan asam laktat dan asam lemak rantai pendek yang biasa disebut dengan *Short Chain Fatty Acid* (SCFA) seperti asam butirat, propionat, dan asam asetat (Febriana dan Prima, 2022). Adanya senyawa SCFA ini dikenal mempunyai beberapa khasiat antara lain dapat menghambat pembentukan kolesterol, mencegah kanker kolon, menurunkan pH kolon sehingga dapat menaikkan pertumbuhan mikroflora di dalam usus, dan menurunkan aktivitas enzim bakterial bersifat karsinogen serta toksik di dalam usus.

Waktu fermentasi merupakan variabel yang berkaitan dengan fase pertumbuhan mikroba selama proses fermentasi berlangsung sehingga akan berpengaruh terhadap hasil fermentasi. Fermentasi mempengaruhi karakteristik minuman fermentasi asam laktat. Waktu fermentasi asam laktat yang terlalu singkat akan menyebabkan pertumbuhan bakteri asam laktat tidak optimal dan jumlah populasinya kurang untuk dikategorikan sebagai probiotik, sedangkan waktu fermentasi yang terlalu lama akan menghasilkan rasa yang terlalu asam pada produk dan juga menyebabkan penurunan jumlah populasi bakteri asam laktat akibat habisnya nutrisi pada substrat dan terakumulasinya metabolit yang bersifat toksik seperti etanol yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat *heterofermentative* (Kusuma dkk., 2020).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, Mikrobiologi FMIPA, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian dan Analisis Sensori. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2022 – Mei 2023.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain timbangan analitik, *cutter*, baskom, kompor, plastik, kain saring, wadah botol kaca, *incubator* (MEMMERT IN30), pisau, spatula, neraca analitik, tisu, aluminium foil, kapas, kain kassa, *vortex* (Thermolyne maxi mix II), hot plate (*magnetic stirrer*), cawan petri, jarum ose, bunsen, tabung reaksi, corong kaca, cawan petri, Erlenmeyer, labu ukur, gelas ukur, mikropipet, pipet tetes, pipet volumetri, gelas bening, mikroskop (Binokuler Nikon E Clips100 halogen), labu ukur, hemositometer, oven, *laminar air flow*, *centrifuge*, autoclave, alat titrasi, pH (Mediatech digital) penangas air, buret, karung nilon bersih, dan alat analisis sensori.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah cairan pulpa kakao yang diperoleh dari petani di Desa Suka Agung, Kec. Bulok Tanggamus, Provinsi Lampung. Bahan lain yang digunakan adalah starter *Saccharomyces boulardii* yang didapat dalam bentuk murni yang diperoleh dari Tokopedia. Bahan-bahan untuk analisa antara lain air destilat, alkohol 96% (Onemed), glukosa (Merck KGaA), sukrosa (Merck KGaA), larutan fenol (Merck KGaA), media Potato Dextrse Agar (PDA) (Merck KGaA), Potato Dextrose Broth (PDA) (Merck KGaA), larutan NaOH 0,1 N (Merck KGaA), bahan analisis kimia lainnya.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) CCD tiga faktor untuk menentukan batasan dan level masing-masing percobaan. Tahapan optimasi variabel dilakukan berdasarkan rancangan percobaan *Central Composite Design* (CCD) yang bertujuan untuk menentukan titik optimum variabel. Pada tahap ini dilakukan 20 satuan percobaan dengan variabel bebas tiga taraf, yaitu lama fermentasi, konsentrasi sukrosa dan konsentrasi inokulum. Percobaan ini menggunakan 3 variabel bebas sehingga nilai rotabilitasnya (α) = 1,681 dan *Central Composite Design* menghasilkan *response surface*. *Respon surface* menghasilkan rancangan percobaan 20 faktorial, 5 *center point*, dan 4 *axial point* (Tabel 1).

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini yaitu lama fermentasi (0, 5, 12.5, 20, dan 25 jam), konsentrasi sukrosa (1.6%, 2%, 2.5%, 3% dan 3.3%) dan konsentrasi inokulum (1%, 2%, 3.5%, 5 dan 6.0%) (Tabel 2). Selanjutnya diperoleh rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan desain percobaan 2^3 yang menunjukkan pada (Tabel 3). Parameter yang diamati tahap kedua yaitu total khamir, total asam asetat, total gula dan uji sensori hedonik yang meliputi aroma dan rasa, warna, dan penerimaan secara keseluruhan. Hasil variable respon selanjutnya dianalisis sidik ragamnya menggunakan program *Desain Expert 12*. Kecocokan dan kesuaian diuji dengan ANOVA.

Tabel 4. Hasil desain *respon surface*

Central Composite Design	Total		Total
Factors	3	Replicates	1
Base runs	20	Total runs	20
Base blocks	1	Total blokcks	1
Two-level factorial Full factorial			
Cube points	14		
Center points in cube	6		
Axial points	6		
Center points in axial	0		
α : 1,681			

Tabel 5. Faktor, variabel, dan taraf variable RSM secara faktorial 2^3 pada proses fermentasi minuman probiotik pulpa kakao

No.	Faktor	Variabel	Taraf Variabel				
			$-\alpha$	Rendah	Tengah	Tinggi	$+\alpha$
			-1,681	-1	0	+1	+1,681
1	Lama Fermentasi (jam)	A	-0,113	5	12,5	20	25,113
2	Konsentrasi Sukrosa(%)	B	1,659	2	2,5	3	3,340
3	Konsentrasi Inokulum (%)	C	0,977	2	3,5	5	6,022

Keterangan:

$$\alpha = \sqrt[4]{(2^k)}$$

taraf

k = jumlah faktor atau variable bebas

$$\text{Jadi, } \alpha = \sqrt[4]{(2^3)} = 1,682$$

Rumus mencari:

$$\pm \alpha 1,68 = X - \text{nilai tengah/ selisih}$$

Tabel 6. Desain percobaan 2^3 faktorial dengan 3 variabel bebas

Run	Lama Fermentasi (jam)	Sukrosa (%)	Inokulum (%)
1	0	2,5	3,5
2	20	2	2
3	12,5	2,5	1
4	12,5	3,3	3,5
5	12,5	2,5	3,5
6	20	2	5
7	12,5	2,5	3,5
8	12,5	2,5	3,5
9	20	3	5
10	12,5	2,5	3,5

Tabel 6. (Lanjutan)

Run	Lama Fermentasi (jam)	Sukrosa (%)	Inokulum (%)
11	5	3	5
12	12,5	2,5	3,5
13	5	2	2
14	12,5	2,5	3,5
15	20	3	2
16	25,1	2,5	3,5
17	5	3	2
18	5	2	5
19	12,5	2,5	6,02
20	12,5	1,6	3,5

Data yang diperoleh diolah menggunakan *Software Design Expert 12* dengan tahapan: (1) menentukan jenis model, (2) analisis sidik ragam model terpilih, (3) menentukan persamaan model dan grafik, dan (4) optimasi formula. Analisis pemilihan model terhadap respon dilakukan berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Square*), pengujian ketidakcocokan model (*lack of fit*), dan ringkasan model secara statistik (*Model Summary Statistics*) untuk dilihat R_2 dan adjusted R_2 . Model yang mungkin terpilih dari metode permukaan respon adalah *Mean, Linear, Quadratic, 2-way interaction*, dan *Cubic*. Respon yang dianalisis menghasilkan satu tipe model yang disarankan oleh program. Kemudian dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA).

Analisis sidik ragam dilakukan berdasarkan nilai P_{value} dari masing-masing respon, model yang baik memiliki nilai P_{value} yang signifikan ($<0,05$). Nilai *Lack of Fit* yang tidak signifikan merupakan syarat untuk model yang baik karena menunjukkan adanya kesesuaian data respon dengan model. Analisis sidik ragam menghasilkan persamaan model yang menggambarkan setiap kondisi penerapan dari variabel yang digunakan (Kumari *et al.*, 2008). Analisis sidik ragam

menghasilkan grafik dalam bentuk gambar kontur dua dimensi (kontur respon) atau permukaan tiga dimensi (respon permukaan).

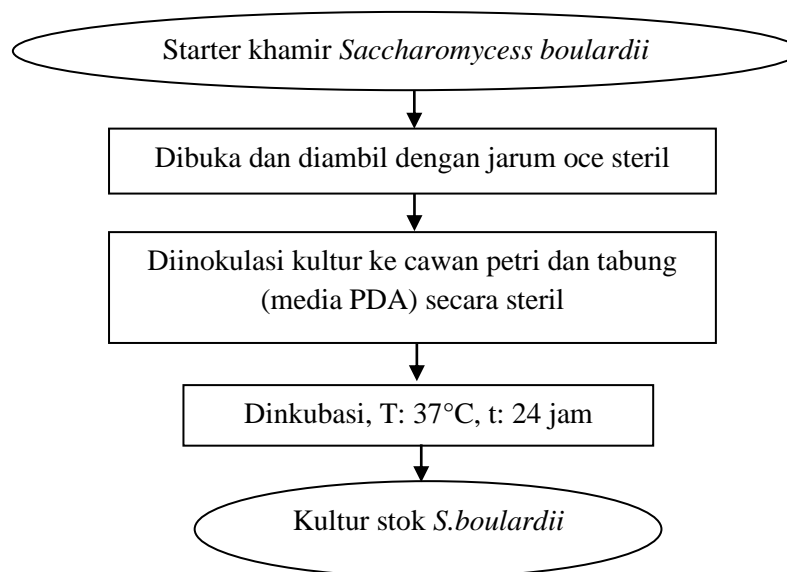
Tahap akhir setelah menentukan model, analisis sidik ragam (ANOVA), persamaan model dan grafik, adalah optimasi lama fermentasi, konsentrasi sukrosa, dan konsentrasi inokulum. Optimasi dapat dilakukan dengan menetapkan variabel dalam batas maksimal, batas minimal atau menetapkan target respon yang dikehendaki. Keluaran dari tahap optimasi adalah rekomendasi beberapa kombinasi konsentrasi yang optimal menurut program. Konsentrasi paling optimal adalah formula dengan nilai yang diinginkan (*desirability*) maksimum. Nilai *desirability* merupakan nilai fungsi tujuan optimasi yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang ditetapkan pada produk akhir. Kisaran nilainya dari 0 sampai 1,0. Nilai *desirability* yang semakin mendekati nilai 1,0 menunjukkan kemampuan program untuk menghasilkan produk yang dikehendaki semakin sempurna. Tujuan optimasi bukan untuk memperoleh nilai *desirability* 1,0, namun untuk mencari kondisi terbaik yang mempertemukan semua fungsi tujuan.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Persiapan Starter

3.4.1.1 Inokulasi Starter Khamir *Saccharomycess boulardii*

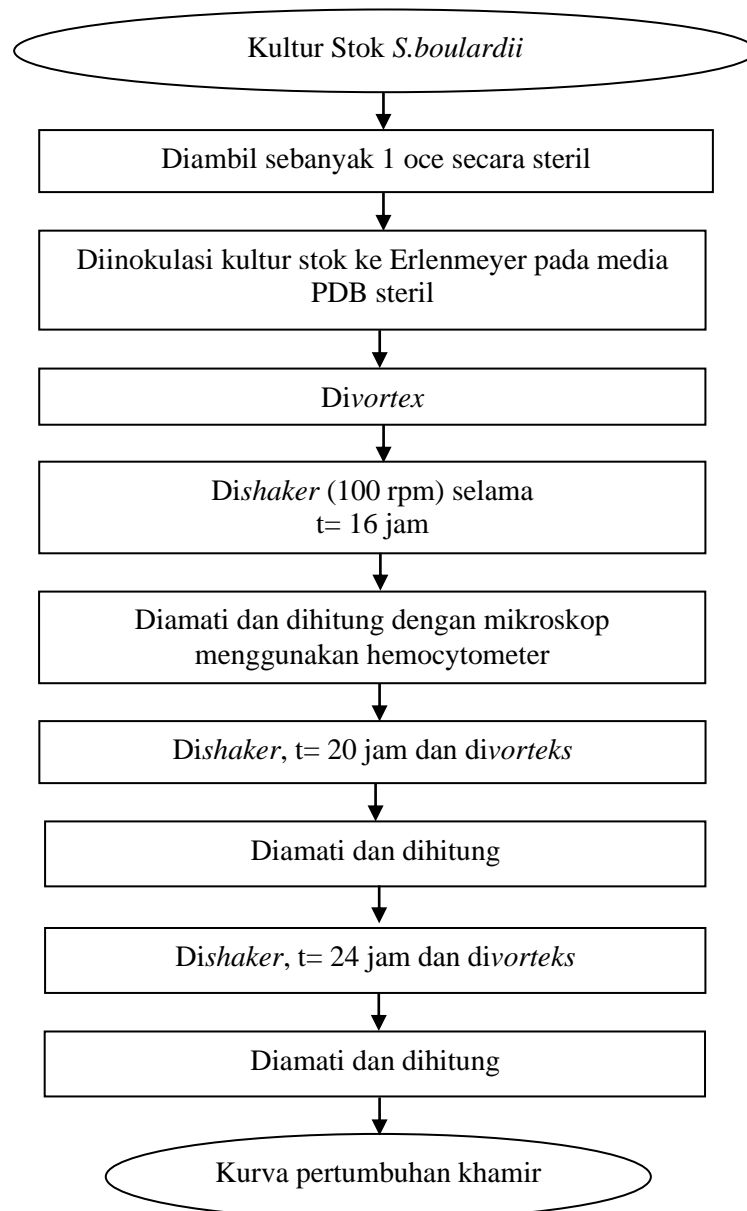
Starter khamir *Saccharomycess boulardii* yang berbentuk kapsul dibuka dan diambil dengan jarum oce steril sebanyak 1 oce didekat bunsen. Lalu diinokulasikan dengan jarum oce menggunakan metode streak kuadran IV pada cawan petri dan tabung yang sudah berisikan media PDA. Setelah itu, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Kemudian setelah 24 jam kultur stok *Saccharomycess boulardii* siap digunakan (Gambar 5).



Gambar 5. Diagram alir pembuatan kultur stok *S.boulardii*

3.4.1.2 Penentuan Waktu Maksimum Sel

Kultur stok *S.boulardii* dan media PDB (*Potato Dextrose Broth*) disiapkan . Pertama stok *S. boulardii* diinokulasikan menggunakan 1 kali pengambilan jarum oce pada media PDA ke Erlenmeyer yang berisi PDB sebanyak 150 ml secara aseptis didekat bunsen di dalam *laminar air flow*. Setelah itu, Erlenmeyer yang telah diinokulasikan divorteks agar mikroba tercampur. Kemudian dishaker dengan kecepatan 100 rpm selama 16 jam lalu diamati dan dihitung dengan mikroskop dengan hemocytometer. Media PDB yang telah diamati dishaker kembali selama 20 jam dan diamati lalu dihitung kembali. Kemudian media PDB dishaker kembali selama 24 jam dan diamati, lalu dihitung menggunakan hemocytometer sehingga didapatkan kurva pertumbuhan terbaik pada khamir yaitu diperoleh waktu 20 jam. Diagram alir penentuan waktu maksimum sel dilihat ada Gambar 6.

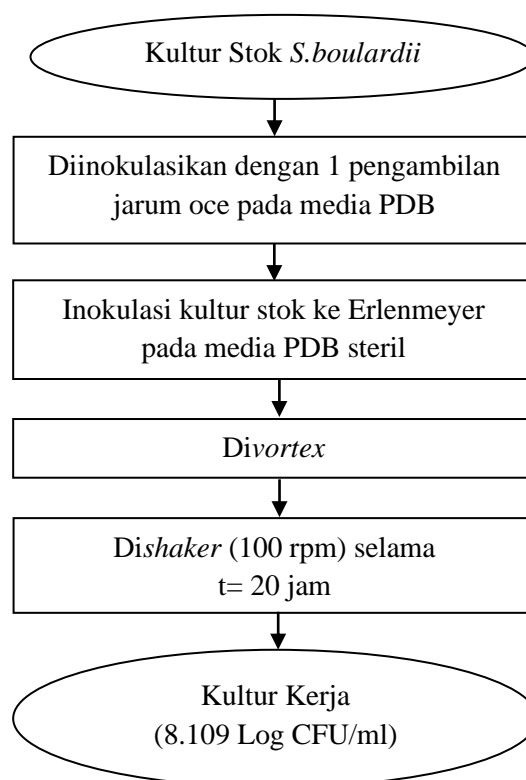


Gambar 6. Penentuan waktu maksimum sel (Dias, 2022).

3.4.1.3 Pembuatan Kultur Kerja Khamir *Saccharomyces boulardii*

Kultur stok *S.boulardii* dan media PDB (*Potato Dextrose Broth*) disiapkan . Pertama stok *S. boulardii* diinokulasikan dengan 1 kali pengambilan jarum oce pada media PDA ke Erlenmeyer yang berisi PDB secara aseptis didekat bunsen di dalam *laminar air flow*. Setelah itu, Erlenmeyer yang telah diinokulasikan *divorteks* agar tercampur dan kemudian dishaker dengan kecepatan 100 rpm selama 20 jam untuk mendapatkan total khamir yang meningkat dan

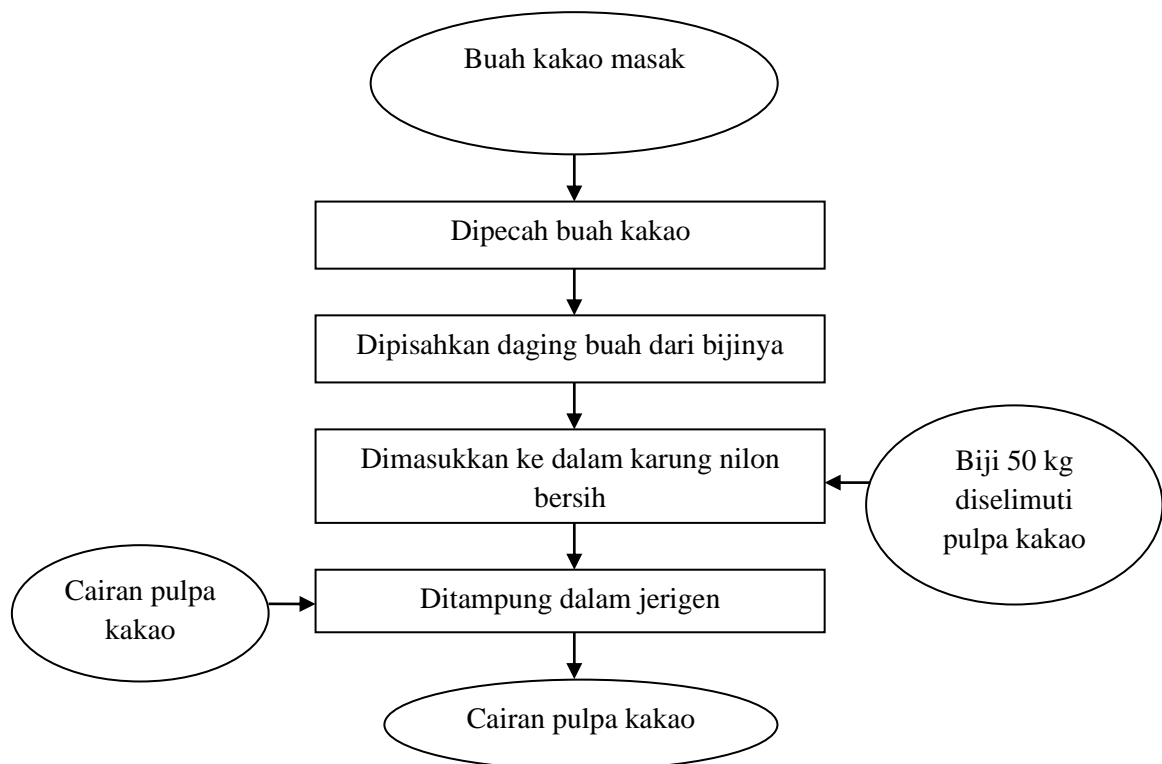
didapatkanlah kultur kerja dengan jumlah 8.109 Log CFU/ml yang siap digunakan. Diagram alir pembuatan kultur kerja dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Diagram alir pembuatan kultur kerja *S. boulardii* (Dias, 2022).

3.4.2 Pengolahan Pulpa Kakao Fermentasi

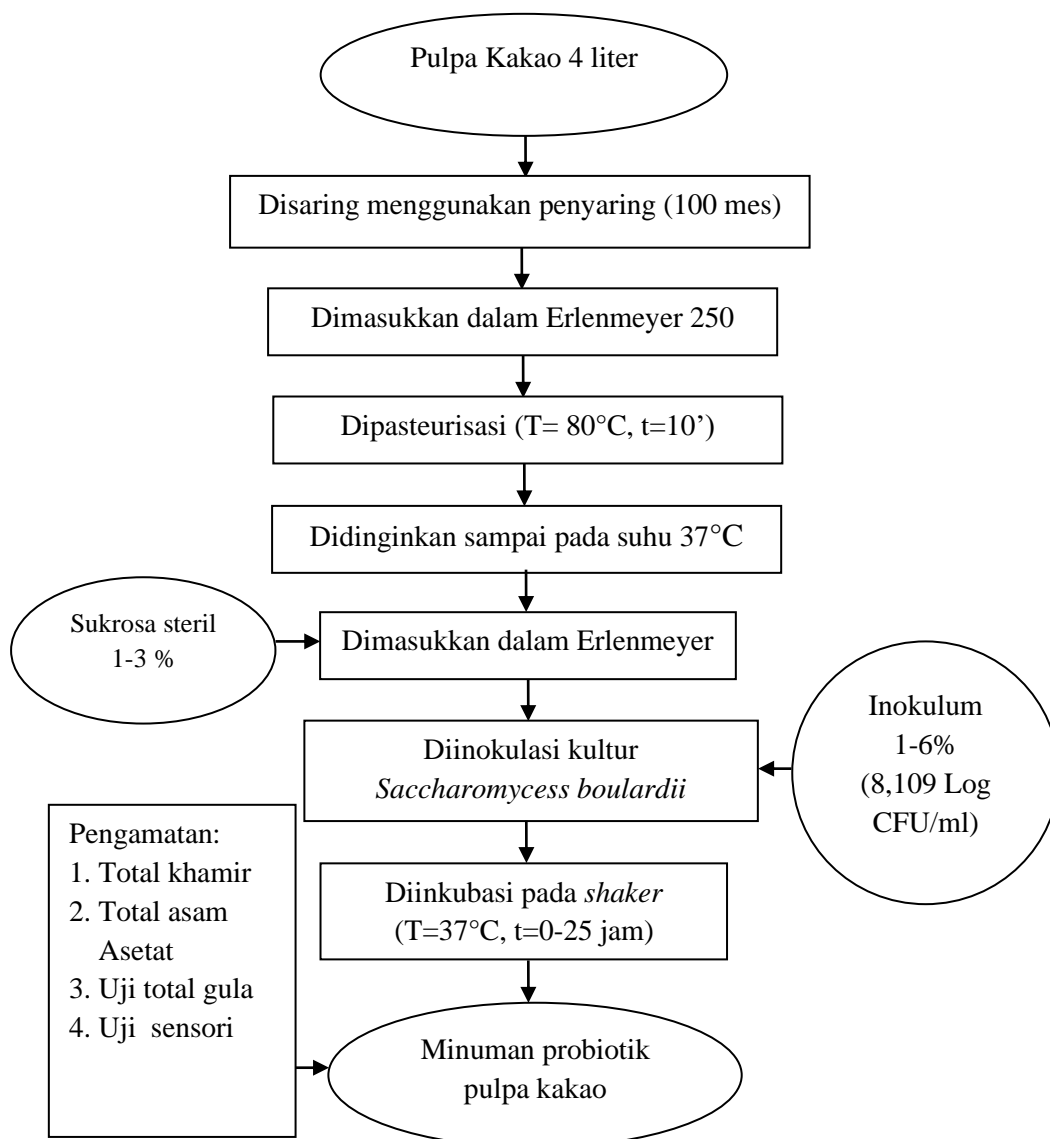
Buah kakao dipetik dan dikumpulkan dari kebun petani, buah dipilih yang sudah matang berwarna merah kekuningan. Selanjutnya dilakukan pengambilan cairan pulpa kakao (*Theobroma cacao L.*) dengan cara sebagai buah kakao yang telah dipanen, dipisahkan kulit dengan isinya (daging buah). Buah yang telah dipanen dipecah dengan balok kayu dan biji sebanyak 50 kg dikeluarkan daging buah berupa biji, plasenta dan pulpa kakao dimasukkan ke dalam karung nilon bersih. Cairan yang keluar ditampung dalam jerigen dan didapatkan cairan pulpa kakao sebanyak 5000 ml. Diagram alir pengolahan pulpa kakao terfermentasi dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Diagram alir pengolahan pulpa kakao terfermentasi (Sabahannur dan Rale, 2018).

3.4.3 Pembuatan Minuman Probiotik Pulpa Kakao

Pulpa kakao sebanyak 4 liter yang telah disiapkan disaring dan dimasukkan ke Erlenmeyer. Erlenmeyer yang berisi pulpa dipasteurisasi dengan *waterbath* pada suhu 80°C selama 10 menit, lalu didiamkan sampai suhu ruang. Kemudian Erlenmeyer dimasukkan sukrosa steril sebanyak 1-3,3 % dan inokulum *Saccharomyces boulardii* sebanyak 1-6,0% dengan jumlah sel 8,109 Log CFU/ml lalu digoyangkan Erlenmeyer perlahan. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang dishaker sesuai dengan waktu lama fermentasi masing-masing sampel yaitu 0-25 jam. Minuman probiotik pulpa kakao yang telah jadi siap dilakukan uji lebih lanjut. Pembuatan minuman probiotik pulpa kakao terlihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir pembuatan minuman probiotik pulpa kakao

3.5 Pengamatan

3.5.1 Perhitungan Total Khamir *Saccharomycess boulardii* (Kristian, 2017)

Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan metode *Counting Chamber*. Jumlah sel sebelum dihitung diencerkan untuk mempermudah pengamatan *counting chamber*. Sampel khamir sebanyak 1ml diambil menggunakan pipet ukur, diencerkan dengan aquadest hingga 10 ml. Sampel diambil secukupnya dengan pipet tetes dan diletakkan pada tepi kaca tutup, maka dengan sendirinya tetesan tersebut akan mengalir ke bawah kaca tutup dan mengisi ruang hitung. Jika

jumlah sel dalam 1 persegi kecil lebih dari 10 sel dan dalam 1 persegi besar lebih dari 100 sel, maka sampel perlu diencerkan kembali. Hemositometer diletakkan pada meja objek mikroskop. Tetapkan 5 titik dari 16 kotak terkecil pada hemasitometer. Hasil perhitungan jumlah sel setiap titiknya di rata – rata. Kemudian jumlah sel/ml dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{Jumlah sel/mL} = \frac{\text{Jumlah sel tiap kotak}}{0,04 \text{ mm}^2} \times \frac{1000}{1} \times \text{faktor pengenceran}$$

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

Pengujian total asam asetat dilakukan menggunakan indikator pH meter. Pertama pH meter dikalibrasi dengan larutan kalibrasi pH 7.01 dan pH 4.01 agar hasilnya lebih akurat. Sampel sebanyak 20 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer selanjutnya dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sambil diukur pH nya. Jika pH sudah mencapai 8,3 maka proses titrasi dihentikan lalu dicatat jumlah NaOH yang terpakai. Perhitungan total asam asetat dilakukan dengan rumus:

$$\text{Total asam asetat (\%)} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{BM asam asetat}}{\text{Volume sampel} \times \text{FP}}$$

Keterangan : N = Normalitas larutan NaOH

FP= faktor pengenceran = 1000

BM asam asetat (CH₃CHOHCOOH) = 60.05

Volume sampel = 10 ml

3.5.3 Pengujian Total Gula (Dubois *et al.*, 1956)

Pengujian total gula ini menggunakan metode fenol-sulfat. Langkah pertama yaitu mempersiapkan sampel terlebih dahulu yang dicentrifuge (10000 rpm) dan lakukan pengenceran (1 ml sampel : 9 ml aquades) dan pembuatan larutan blanko. Setelah itu membuat larutan fenol 5% dengan cara fenol 50 g dilarutkan dalam satu liter aquades. Kemudian membuat kurva standar yang dilakukan dengan cara membuat larutan induk sukrosa dengan melarutkan 100 mg sukrosa dalam 100 ml aquades. Pembuatan larutan standar sukrosa dengan cara mengencerkan 10 ml larutan induk sukrosa dengan aquades sampai volume 100 ml dan diambil sebanyak 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 dan 1 ml.

Kemudian larutan diencerkan dengan aqudest sampai dengan volume 1 ml. Larutan diambil sebanyak 0,5 ml dari setiap konsentrasi larutan standar sukrosa. Larutan fenol 5% sebanyak 0,5 ml ditambahkan dalam tabung reaksi dan *vortex*. Larutan asam sulfat pekat sebanyak 2,5 ml ditambahkan dengan cepat secara tegak lurus kepermukaan cairan. Larutan didiamkan selama 10 menit, *vortex* selama 30 detik, dan ditempatkan dalam *water bath* yang barisi air hangat selama 15-20 menit sehingga terbentuk warna *orange-yellow* yang stabil. Kemudian larutan diukur absorbansinya pada 490 nm dengan spektrofotometer. Analisis pada sampel dilakukan dengan memasukkan 0,5 ml sampel ke dalam tabung reaksi dan lakukan tahap seperti pada pembuatan kurva standar. Perhitungan konsentrasi gula dalam sampel ditentukan dengan menggunakan kurva standar dan memperhitungkan pengenceran yang dilakukan. Rumus perhitungan adalah sebagai berikut.

$$\text{Total gula (\%)} = \frac{(G \times FP)}{W} \times 100$$

Keterangan : G = konsentrasi gula dari kurva standar (mg/ml)

FP = faktor pengenceran

W = berat contoh (mg) atau ml

3.5.4 Pengujian Sensori

Uji sensori meliputi uji hedonik memiliki tujuan yaitu untuk mengetahui pengujian aroma dan rasa, warna, serta penerimaan keseluruhan pada minuman probiotik pulpa kakao. Uji hedonik merupakan pengujian yang paling banyak digunakan untuk mengukur tingkat kesukaan terhadap produksi (Permadi dkk., 2019). Penilaian sensori minuman probiotik pulpa kakao dilakukan dengan uji hedonik. Uji hedonik dilakukan oleh panelis tidak terlatih sebanyak 40 orang. Sampel yang diuji adalah minuman probiotik pulpa kakao sebanyak 20 sampel. Sampel yang diuji dibagi menjadi 3 kelompok pengujian, dengan setiap kelompok pengujian terdapat 6-7 sampel. Sampel dituang dalam gelas bening sebanyak 20 ml dan diberi kode acak dan air penawar. Selanjutnya panelis diminta untuk memberikan pendapatnya dengan memilih tiga sampel yang paling ideal dari masing-masing kloter (Tabel 7,8 dan 9).

Tabel 7. Kuisoner Uji Hedonik Kloter Pertama

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

KUESIONER UJI HEDONIK

A. Uji Hedonik

Petunjuk Pengisian:
Di hadapan anda disajikan 7 sampel minuman probiotik pulpa kakao yang diberi kode acak. Anda diminta untuk menilai aroma dan rasa, warna, serta penerimaan keseluruhan dengan memberikan skor penilaian uji hedonik skala 1 sampai 5 seperti terlampir.

Parameter	290	122	865	317	525	909	884
Aroma dan rasa							
Warna							
Penerimaan Keseluruhan							

Keterangan:

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

B. Alasan Memilih Suka atau Tidak Suka

Saudara/i diminta untuk menuliskan alasan memilih suka/tidak suka terhadap produk yang dipilih berdasarkan “**aroma dan rasa, warna, serta penerimaan keseluruhan**” pada kolom yang sudah disediakan.

<p>Sampel yang disukai:</p> <p>Alasan:</p>	<p>Sampel yang tidak disukai:</p> <p>Alasan:</p>
---	---

Tabel 8. Kuisoner Uji Hedonik Kloter Kedua

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

KUESIONER UJI HEDONIK

A. Uji Hedonik

Petunjuk Pengisian:
Di hadapan anda disajikan 7 sampel minuman probiotik pulpa kakao yang diberi kode acak. Anda diminta untuk menilai aroma dan rasa, warna serta penerimaan keseluruhan dengan memberikan skor penilaian uji hedonik skala 1 sampai 5 seperti terlampir.

Parameter	774	920	144	809	490	390	214
Aroma dan rasa							
Warna							
Penerimaan Keseluruhan							

Keterangan:

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

B. Alasan Memilih Suka atau Tidak Suka

Saudara/i diminta untuk menuliskan alasan memilih suka/tidak suka terhadap produk yang dipilih berdasarkan “**aroma dan rasa , warna, serta penerimaan keseluruhan**” pada kolom yang sudah disediakan.

<p>Sampel yang disukai:</p> <p>Alasan:</p>	<p>Sampel yang tidak disukai:</p> <p>Alasan:</p>
---	---

Tabel 9. Kuisoner Uji Hedonik Kloter Ketiga

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

KUESIONER UJI HEDONIK

A. Uji Hedonik

Petunjuk Pengisian:
Di hadapan anda disajikan 6 sampel minuman probiotik pulpa kakao yang diberi kode acak. Anda diminta untuk menilai aroma, rasa, warna, dan penerimaan keseluruhan dengan memberikan skor penilaian uji hedonik skala 1 sampai 5 seperti terlampir.

Parameter	890	501	930	110	350	245
Aroma dan rasa						
Warna						
Penerimaan Keseluruhan						

Keterangan:

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

B. Alasan Memilih Suka atau Tidak Suka

Saudara/i diminta untuk menuliskan alasan memilih suka/tidak suka terhadap produk yang dipilih berdasarkan **“Aroma dan rasa, warna, serta penerimaan keseluruhan”** pada kolom yang sudah disediakan.

Sampel yang disukai:	Sampel yang tidak disukai:
Alasan:	Alasan:

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Lama fermentasi, sukrosa, dan inokulum berpengaruh nyata terhadap total khamir, dan total gula pada minuman probiotik pulpa kakao dengan penambahan *S. boulardii* sebagai starternya.
2. Terdapat interaksi lama fermentasi, sukrosa dan inokulum *S. boulardii* pada minuman probiotik pulpa kakao yang terlihat pada respon prediksi RSM optimasi terbaik yaitu lama fermentasi terbaik 20 jam, konsentrasi sukrosa terbaik 3%, dan konsentrasi inokulum 5% dengan uji total khamir terbaik sebesar 7.479 Log CFU/ml, total asam asetat 0,434%, total gula 10.358%, aroma dan rasa dengan skor 3,975, warna 3,453, serta penerimaan keseluruhan sebesar 3,891. Perlakuan terbaik tersebut memiliki karakteristik dengan dihasilkannya nilai *desirability* sebesar 0,760.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penyesuaian media fermentasi pulpa kakao untuk pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* agar jumlah khamir yang dihasilkan lebih maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Adib, A. 2015. Fungsi Probiotik dalam Saluran Cerna dan Kesehatan. <http://foodtech.binus.ac.id/2015/07/08/fungsi-probiotik-dalam-salurancerna-dan-kesehatan/> [Diakses pada 08 Februari 2017 pukul 05:48 WIB]. 4 hlm.
- Afrianti, H. 2013. Teknologi Pengawetan Pangan. Alfabeta, Bandung.
- Aridona, M.P., Wartini, N.M dan Arnata I.W. 2015. Pengaruh Lama Fermentasi Alami Secara Aerob Cairan Pulpa Hasil Samping Fermentasi Biji Kakao Terhadap Karakteristik Cuka Fermentasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol.3(3): 82-94.
- Azizah,N., Baarri,N., dan Mulyani,S. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol.1(2).
- Badan Standarisasi Nasional (BSN). 1996. SNI 01-4371-1996. Cuka Departemen Perindustrian Indonesia. Jakarta.
- Badan Standarisasi Nasional. SNI 7552:2009. Minuman Susu Fermentasi Berperisa, Jakarta: Badan Standarisasi Nasional, 2009
- Benninga, H. 1990. A History of Lactic Acid Making : A Chapter in the History of Biotechnology. Springer Science and Business Media. London. 478 hlm.
- Candra, A., Fasih, I., dan Dina, N. 2020. Production of Kombucha Tea as Alternative Source of Probiotic Drink in Mandailing Sub-district Tebing Tinggi City. *Abdimas Talenta*. Vol. 5(2), 553.
- Capece, A., Romaniello, R., Pietrafesa,A., Siesto,G., dan Pietrafesa,R. 2018. Use Of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardi* in Co-Fermentations With *S. cerevisiae* For The Productions Of Craft Beer With Potential Health Value-added. *International Journal Of The Food Microbiology*. 22-30.

- Chan, M.Z.A. dan Liu, S.Q. 2022 Fortifying Food With Synbiotic and Postbiotic Preparations of The Probiotic Yeast, *Saccharomyces boulardii*. *Current Opinion In Food Science*. 216-224.
- Chan, M.Z., dan Shao, Q. L. 2022. Fortifying Foods with Synbiotic and Postbiotic Preparations of The Probiotic Yeast, *Saccharomyces boulardii*. *Science Direct*. 43: 216-224.
- Chan, M.Z.A., Toh, M., dan Liua, S. 2021. Growth, Survival, and Metabolic Activities of Probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM-1745 Fermented Coffee Brews. *International Journal of Food Microbiology*.
- Craack, M., Keul, H., Eskildsen, C.E., Petersen, M.A., Saerens, S., Blennow Nielsen, D.S. (2014). Kunci untuk Simulasi Fermentasi Bakteri Asam Asetat dan Lingkungan dan Sensorik dari Profil Cokelat. *Riset Pangan Internasional*. 63: 306-316.
- Dasa, D., Y., Putra, G. Dan Gunam, I. 2017. Karakteristik Cuka Dari Cairan Pulpa Hasil Samping Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Perlakuan Penambahan Inokulum *Acetobacter aceti* dan Lama Fermentasi. *Jurnal rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol. 5(2):28-37
- Devita, M., Rizqiati, H., dan Pramono, B. 2019. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Alkohol Total BAL Kefir Prima Susu Kambing. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol. 3(2): 204-206.
- Dias, I., A., G. 2022. *Use of Saccharomyces boulardii In Alcohol-Free Beer Production. Tecnico Lisboa. Thesis to obtain the Master of Science Degree In.*
- Diaz, L.J., A. Caballero, and A. Segura. 2017. *Pathways for the Degradation of Fatty Acids in Bacteria. Springer International Publishing, Spain.*
- Febriana, E., dan Prima, R. 2022. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Minuman Probiotik Sari Tomat dengan Kultur Starter *L. plantarum* B1765. *Journal of Chemistry*. Vol. 11(2).
- Fitri, E. 2021. *Pemanfaatan Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) Sebagai Produk Minuman Antioksidan Penghambat Aktivitas Radikal Bebas Dalam Tubuh Manusia. Universitas Negeri Malang, Sumatera Barat.*

- Food Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 2001. Guidelines for The Evaluation of Probiotics in Food. *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for The Evaluation of Probiotics in Food*. Canada. 56 hlm.
- Haryadi dan M. Supriyanto. 1991. *Pengolahan Kakao Menjadi Bahan Pangan*. Pusat Antar Universitas. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Hawusiwa, E.S., Wardani, A.K., & Ningtyas, D.W. (2015). Pengaruh Konsentrasi Pasta Singkong (*Manihot esculenta*) dan Lama Fermentasi Pada Proses Pembuatan Minuman Wine Singkong. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*: 147-155.
- Im, E., dan Pothoulakis, C. (2010). *Progres récents dans la recherche sur Saccharomyces boulardii*. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 34:S62–S70.
- Insani, H., H. Rizqiati, dan Y. Pratama. 2018. Pengaruh Variasi Konsentrasi Sukrosa Terhadap Total Khamir, Total Padatan Terlarut, Kadar Alkohol, dan Mutu Hedonik Pada Water Kefir Buah Naga Merah. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol.2(2): 90–95.
- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Loncar, E.S., Vitas, J.S., & Sathishkumar, M., (2014). A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea tungus. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. 13, 538–550.
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Xiao, L., Li, X. and Hu, M. 2017. *Effect Of Fermentation Parameters and Their Optimization On The Phytochemical Properties Of Lactic Acid Fermented Mulberry Juice*. *Journal Of Food Measurement and Chatacterization*. Vol.11(3): 1462-1473.
- Keshani, S., Luqman C. A., Nourouzi, M.M., Russly, A.R., Jamilah, B. 2010. *Optimization Of Concentration Process On Pomelo Fruit Juice Using Response Surface Methodology (RSM)*. *International Food Research Journal*. Vol.17(3): 733–742.
- Kusnandar, F. 2019. *Kimia Pangan Komponen Makro*. Bumi Aksara. Jakarta.
- Kusuma, G.P., Komang, A., dan I, D.P. 2020. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik *Fermented Rice Drink* Sebagai Minuman Probiotik dengan Isolat *Lactobacillus sp.* F213. *Jurnal Itepa*. Vol. 9(2):182-193.

- Lengkey, H. A.W., and R. L. Balia. 2014. The Effect of Starter Dosage and Fermentation Time on pH and Lactic Acid Production. *Biotechnology in Animal Husbandry*. Vol. 30(2):339 – 347.
- Lindasari, F., Maheswari, R. R. A., Atabany, A., dan Soenarno M. 2017. Karakteristik Yoghurt Probiotik Ekstrak Kayu Manis dari Susu Kambing Hasil Pemberian Pakan Campuran Garam Karboksilat Kering. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan* . Vol. 1(2): 80-87.
- Lohenapessy,S.,Gunam ,I., dan Arnata,I., 2017.Pengaruh Berbagai Merek Dried Yeast (*Saccharomyces sp.*) dan pH Awal Fermentasi Terhadap Karakteristik Wine Salak Bali. *Jurnal teknologi Industri dan Hasil Pertanian*. Vol.22(2).
- Mandang, F.O., Dien,H., dan Yelnetty, A. 2016. Aplikasi Penambahan Konsentrasi Susu Skim Terhadap Kefir Susus Kedelai (*Glycine Max Semen*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. Vol.4(1).
- Mardalena. 2016. Fase Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Tempoyak Asal Jambi yang disimpan Pada Suhu Kamar. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*. Vol.11(1): 58-66.
- Maryana,D. 2014. Pengaruh Penambahan Sukrosa Terhadap Jumlah Bakteri dan Keasaman Whey Fermentasi dengan Menggunakan Kombinasi *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus acidophilus*. Universitas Hasanudin, Makasar.
- Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H., Hardinejad, M.,Djomeh, Z.E., Mirzapour, M. 2013.Effect of fermentation of pomegranate juice by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* on the antioxidant activity and metabolism of sugars, organic acids and phenolic compounds. *Food Biotechnology*. Vol. 27(1):1-13.
- Mubin, M. F. dan Zubaidah, E. 2016. Studi Pembuatan Kefir Nira Siwalan (*Borassus flabellifer L.*) (Pengaruh Pengenceran Nira Siwalan dan Metode Inkubasi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.4(1) :291-301.
- Muizuddin, M. & Zubaidah, E. 2015. Studi aktivitas antibakteri kefir teh daun sirsak (*Annona muricata linn.*) dari berbagai merk teh daun sirsak dipasaran. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. 3(4): 1662-1672.
- Mulyakin, S. 2020. *Kajian Penambahan Gula Pasir Terhadap Sifat Kimia dan Organoleptik Sirup Kersen*. Universits Muhammadiyah Mataram. Mataram.

- Mulyatni, A. S., Budiani, A., & Taniwiryo, D. (2012). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao L.*) Terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus*. *Menara Perkebunan*, Vol. 80(2) :77-84.
- Murugan, K and S. Al-Sohaibani. 2012. *Valorization of Food Processing By-products*. CRC Press Taylor and Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW. 455- 488.
- Nakazawa, Y. and A. Hosono. 1992. *Functions of Fermented Milk : Challenges for the Health Sciences*. Elsevier Applied Science. New York. 518 hlm.
- Niamah, A. K. 2017. Karakteristik Fisikokimia dan Mikroba Yogurt dengan Penambahan *Saccharomyces Boulardi*. *Jurnal Ilmu Gizi dan Pangan*. Vol.5(3).
- Ninda,F. S. 2022. *Sensori Kombucha Pulpa Kakao dan Pendugaan Harga Pokok Produksi: Efek Penambahan Jahe (Zingiber officinale)*. Universitas Lampung, Lampung.
- Ningsih, R., Rizqiyati, A., dan Nurwantoro. 2019. Total Padatan Terlarut, Viskositas, Total Asam, Kadar Alkohol, dan Mutu Hedonik Water Kefir Semangka Dengan Lama Fermentasi Yang Berbeda. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol. 3(2) :325-331.
- Nurainy, F., Rizal, S., Suharyono. 2015. Aktivitas Antibakteri dan Evaluasi Pengaruh Minuman Sinbiotik Ekstrak Cincau dengan Penambahan Sari Buah Terhadap Kualitas Mikroflora Pencernaan. *Prosiding Seminar Nasional*. Penerbit Universitas Katolik Soegijapranata. Semarang. ISBN : 978- 602-6865-01-4.
- Nurainy,F., Rizal ,S., Suharyo,S., dan Umami,E. 2018. Karakteristik Minuman Probiotik Jambu Biji (*Psidium guajava*) pada Berbagai Variasi Penambahan Sukrosa dan Susu Skim. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. Vol.7(2).
- Nurhidayah. 2018. Pengolahan Limbah Kulit Buah Kakao dengan Memanfaatkan Isolat Bakteri dari Cairan Pulp Kakao Sebagai Bioaktivator dalam Pengomposan. *Thesis*. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Pranayanti, I. A dan Aji,S. 2015. Pembuatan Minuman Probiotik Air Kelapa Muda (*Cocos nucifera L.*) dengan Starter *Lactobacillus casei strain Shirota*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.3(2):763-772.

- Pereira, A.L.F., Maciel, T.C., Rodrigues, M.C. 2011. *Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei*. *Food Research International*. Vol. 44 (5):1276-1283. DOI :10.1016/J.foodres.2010.13.035.
- Pereira, A.L., Rodrigues, S. (2018). *Fruit Juices Extraction, Composition, Quality and Analysis: Turning Fruit Juice into Probiotic Beverages*. Academic Press. 279-287.
- Perkasa, B. H., Joni, K dan Erni, S. M. 2021. Optimasi Penambahan Kitosan dan Lama Perendaman Terhadap Fisikokimia Cabai Keriting (*Capsicum Annuum L.*) Menggunakan RSM. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.9(1): 13-24.
- Permadi, M., Huda, O., dan Khafidurrohman, A.2019. Perancangan Pengujian Preference Test, Uji Hedonik dan Mutu Hedonik Menggunakan Alogaritma Radial Basis Function Network. *Science and Information Technology*. Vol.2(2).
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., Corbo, M.R. 2015. *Challenges for the production of probiotic fruit juices*. *Beverages*. 1: 95-103.
- Puerari, C., Magalhães, K.T., & Schwan, R.F. (2012). *New Cocoa Pulpa-Based Kefir Beverages : Microbiological, Chemical Composition and Sensory Analysis*. *Food Research International*. 48 : 634-640.
- 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*. Vol. 5(1).
- Retnowati, P dan Kusnadi, J,2014. Pembuatan Minuman Probiotik Sari Buah Kurma (*Phoenix dactylifera*) Dengan Isolat *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus plantarum*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.2(2):70-81.
- Ridhani, M.A., Vidyaningrum, I. P., Akmala, N., Fatihatunisa, R., Azzahro, dan Aini, N. 2021. Potensi Penambahan Berbagai Jenis Gula Terhadap Sifat Sensori dan Fisikokimia Roti Manis. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol.8(3).
- Rizal, S., Erna, M., dan Nurainy, F. 2016. Karakteristik Probiotik Minuman Fermentasi Asetat Sari Buah Nanas dengan Variasi Jenis Bakteri Asam Asetat. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*. 63-71.

- Rizal, S., Marniza, Nurainy, F. 2015. Pemanfaatan Kulit Nanas Pada Pembuatan Minuman probiotik dengan jenis bakteri asam asetat berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi VI*. Lembaga Penelitian dan Penelitian Unila. Bandar Lampung. 459-473.
- Rohmah, Sri, S., Irnia, N. 2021. Optimasi Produksi Senyawa Vanilim dari Biokonversi Lignoselulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit dengan *Phanerochaete Chrysosporium* Menggunakan *Response Surface Method*. *Jurnal Teknologi Pertanian*. Vol. 22(3): 201-210.
- Santi, S.S. 2008. Pembuatan Alkohol dengan Proses Fermentasi Buah Jambu Mete Oleh Khamir *Saccharomyces Cerevisie*. *Jurnal Penelitian Ilmu Teknik*. Vol.8(2):104-111.
- Sa'adah, N. 2018. *Pembiakan Khamir Saccharomyces cerevisiae dan Uji Antagonis Terhadap Gloeosporium sp. Penyebab Penyakit Busuk Buah Pada Apel*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Sari, A., Nurwantoro, dan Antonius. 2019. Pengaruh Penggunaan F1 Grain Kefir Sebagai Starter Terhadap Kadar Alkohol, Total Khamir dan Kesukaan Kefir Optima. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol. 4(2): 137-144.
- Satryo, B. D., Putra, G.P., dan Arnata, W. 2015. Pengaruh Penambahan Ragi Tape dan Waktu Fermentasi Terhadap Karakteristik Cairan Pulpa Hasil Samping Fermentasi BijiKakao. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol. 3(2):11-18.
- Senkarcinova, B., Dias, I.A.G., Nespor, J., dan Branyik, T. 2019. Probiotic Alcohol-Free Beer Made With *Saccharomyces cerevisiae var. bouldardii*. *Food Science and Technology*. 362-367.
- Setiani, B., Sunarko, K., dan Mulyani, S. 2019. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Total Asam, Total Bakteri Asam Asetat dan Warna Kefir Belimbing Manis (*Averrhoa carambola*). *Jurnal Ilmiah Sains*. Vol. 21(2) :113-118.
- Setiarto, B. H., N. Widhyastuti, N. A. Rikmawati. 2017. Optimasi Konsentrasi Fruktooligosakarida Untuk Meningkatkan Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat Starter Yoghurt. *Jurnal Veteriner*. Vol.18(3): 428-440.
- Simanjuntak, R. J. D. 2017. Efek Antibakteri Kopi Robusta yang difermentasi dengan Kombucha Terhadap *Salmonella Typhi*. *Skripsi*. Universitas Lampung.

- Suharyono, S. Rizal, F. Nurainy, M. Kurniadi. 2012. Pertumbuhan *L.casei* Pada Berbagai Lama Fermentasi Minuman Sinbiotik dari Ekstrak Cincau Hijau (*Premna oblongifolia merr*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. Vol.5(2): 117-128.
- Suryani, Y., Hernaman, I., dan Ningsih. 2017. Pengaruh Penambahan Urea dan Sulfur Pada Limbah Padat Bioetanol Yang di Fermentasikan EM-4 Terhadap Kandungan Protein dan Serat Kasar. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. Vol. 5(1): 13-17.
- Susilowati, A., 2013. Perbedaan Waktu Fermentasi dalam Pembuatan Teh Kombucha dari Ekstrak Teh Hijau Lokal Arraca kiara, Arraca yabukita, Pekoe dan Dewata Sebagai Minuman Fungsional untuk Antioksidan, Prosiding SNST ke- 4. Universitas Wahid Hasyim, Semarang : 28-33.
- Utami, C. R. 2018. Karakteristik Minuman Probiotik Fermentasi *Lactobacillus casei* dari Sari Buah Salak. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol.9(1):1-9.
- Vasquez, Z. S., Neto, D. P. C., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., De Oliveira, P. Z., Tirbucio, P. B., Rogez, H. L. G., Neto, A. G. and Soccol, C. R. 2019. *Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review*. *J. Waste Management*. 90: 72-83.
- Wasilu, R., Suryani, U., dan Siti, A. 2021. Karakteristik Kimia, Mikrobiologi, dan Organoleptik Water Kefir Sari Buah Pepaya (*Carica papaya L.*) Berdasarkan Lama Fermentasi dan Konsentrasi Sukrosa. *Jurnal Teknologi Pangan*. Vol.3(2).
- 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, 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*. Vol. 1(3):1-80.
- Yanti N.A., Ambardini, S., Marlina, W.O., dan Cahyanti, K.D. 2010. Aktivitas Antibakteri Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) (Dengan Konsentrasi Gula Berbeda. *Jurnal berkala Saintek*. Vol.8(2):35-40.
- Yan, L. dan Kim, H. 2011. *Effect of Dietary Grape Pomace Fermented by Saccharomyces boulardii on The Growth Performance, Nutrient Digestibility and Meat Quality in Finishing Pigs*. *J. Science*. 24(2).

- Yuliana, N., Tintan, N., dan Sutikno. 2016. Karakteristik Minuman Laktat Sari Buah Durian Lay (*Durio kutejensis*) yang Disuplementasi dengan Kultur *Lactobacillus* selama Penyimpanan pada Suhu Rendah. *Jurnal AGRITECH*. Vol. 36(4): 424-432.
- Yuliana, N., Fibrana, N., Gusrisnti W., Sumardi., Endang, L. W. 2023. Total Microbe, Physicochemical Property, and Antioxidative Activity During Fermentation of Cocoa Honey Into Kombucha Functional Drink. *Applied Food Research*. Vol. (3).
- Yuniastuti, A. (2015). Buku Monograf: *Probiotik (Dalam Perspektif Kesehatan)*. Semarang: UNNES PRESS.
- Yunus Y., E. Zubaidah. 2015. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa dan Lama Fermentasi Terhadap Viabilitas *L. casei* Selama Penyimpanan Beku Velva Pisang Ambon. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol.3(2) : 303- 312.