

**PENGARUH LAMA FERMENTASI, KONSENTRASI GULA DAN  
INOKULUM TERHADAP PERTUMBUHAN *Saccharomyces boulardii*  
PADA MEDIA FERMENTASI PULPA KAKAO**

**SKRIPSI**

**Oleh**

**Zikrina Marentina  
1957061001**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

## ABSTRAK

### PENGARUH LAMA FERMENTASI, KONSENTRASI GULA DAN INOKULUM TERHADAP PERTUMBUHAN *Saccharomyces boulardii* PADA MEDIA FERMENTASI PULPA KAKAO

Oleh

**Zikrina Marentina**  
**NPM 1957061001**

Pulpa kakao merupakan jaringan berlendir yang membungkus biji kakao, dimana pada penelitian ini pulpa kakao dijadikan starter dengan penambahan khamir *Saccharomyces boulardii* dan akan diberikan beberapa perlakuan seperti penentuan lama fermentasi, penambahan gula dan inokulum. Penentuan pengaruh konsentrasi optimum menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM). Pengamatan penelitian ini meliputi total khamir, nilai pH, konsentrasi larutan (°brix) dan pengujian anti mikroba. Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa perhitungan total khamir menunjukkan faktor lama fermentasi yang berpengaruh, pengujian pH menunjukkan tidak adanya faktor yang berpengaruh, pengujian padatan terlarut (°Brix) menunjukkan faktor penambahan gula yang berpengaruh dan pada pengujian anti mikroba menunjukkan faktor gula dan interaksi antara lama fermentasi dan inokulum yang berpengaruh. Solusi optimasi fermentasi pulpa kakao pada waktu fermentasi terbaik berkisar 20 jam, konsentrasi gula sebesar 2% dan konsentrasi inokulum sebesar 2% dengan memiliki nilai *desirability* yang tinggi sebesar 0,883

Kata kunci: Fermentasi, Pulpa Kakao, RSM, *Saccharomyces boulardii*

**PENGARUH LAMA FERMENTASI, KONSENTRASI GULA DAN  
INOKULUM TERHADAP PERTUMBUHAN *Saccharomyces boulardii*  
PADA MEDIA FERMENTASI PULPA KAKAO**

**Oleh  
Zikrina Marentina**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

**Pada  
Program Studi Biologi Terapan  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2023**

Judul Skripsi

: **PENGARUH LAMA FERMENTASI, KONSENTRASI GULA DAN INOKULUM TERHADAP PERTUMBUHAN *Saccharomyces boulardii* PADA MEDIA FERMENTASI PULPA KAKAO**

Nama Mahasiswa

: **Zikrina Marentina**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **1957061001**

Program Studi

: **Biologi Terapan**

Fakultas

: **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. **Komisi Pembimbing**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Prof. Dr. Sumardi, M. Si**  
NIP. 196503251991031003

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

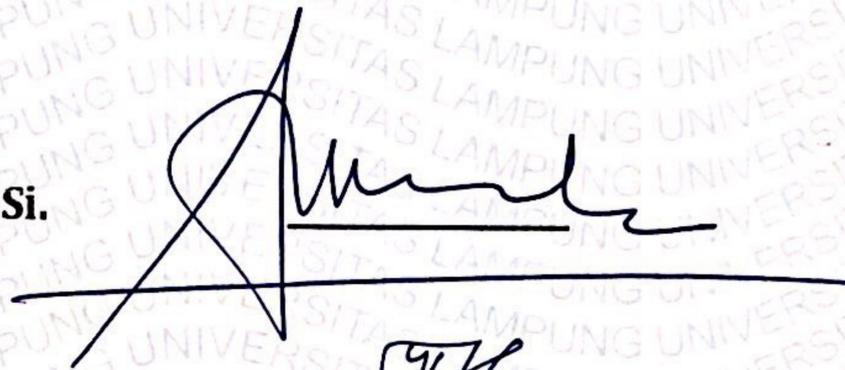
2. **Ketua Jurusan Biologi FMIPA**

**Dr. Jani Master, S.Si., M. Si**  
NIP.198301312008121001

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Prof. Dr. Sumardi, M.Si.**



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



**Penguji  
Bukan Pembimbing : Dr. Kusuma Handayani, M.Si.**



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
**NIP. 19711001 200501 1 002**

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 27 Agustus 2023**

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zikrina Marentina  
NPM : 1957061001  
Jurusan : Biologi/ Biologi Terapan  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Meyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya sungguhnya bahwa skripsi saya yang berjudul “Pengaruh lama fermentasi, konsentrasi gula dan inokulum terhadap pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* pada media fermentasi pulpa kakao” Adalah benar karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku.

Selanjutnya, saya juga tidak keberatan apabila sebagian atau seluruh data pada skripsi ini digunakan oleh dosen dan/atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan. Jika dikemudian hari terbukti pernyataan saya tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum.

Bandar Lampung, 16 Oktober 2023

Yang menyatakan,



Zikrina Marentina  
NPM. 1957061001

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Zikrina Marentina dilahirkan di Kota Bandar Lampung pada 06 Maret 2000. Penulis merupakan putri pertama dari pasangan Bapak Agus Wahyudiono dan Ibu Eva Yuliana. Penulis mengenyam pendidikan di Taman Kanak Kanak Islam Terpadu Syifa Fikriya pada tahun 2004-2005, penulis melanjutkan pendidikan

Sekolah Dasar di SDIT Syifa Fikriya 2006-2012, penulis melanjutkan pendidikan di MTs Ibad Ar-Rahman *Islamic Boarding School* Pandeglang- Banten pada 2012-2015 dan menyelesaikan sekolah menengah atas di Madrasah Aliyah Swasta (MAS) Modern Sahid *Islamic Boarding School* 2015-2018. Pada tahun 2018, penulis sempat berkuliah di Universitas Bandar Lampung (UBL) pada prodi Teknik Sipil, lalu pada tahun 2019 penulis diterima di Perguruan Tinggi Universitas Lampung (UNILA) sebagai mahasiswa Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam melalui jalur Seleksi Mandiri Masuk Perguruan Tinggi Negeri Wilayah Barat (SMM PTN-Barat). Adapun kegiatan organisasi yang pernah diikuti yaitu UKM-U Bulu Tangkis Unila sebagai anggota dan Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) sebagai Anggota Bidang Kaderisasi dan kepemimpinan periode 2020-2021. Penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Balai Karantina Ikan dan Pengendalian Mutu (BKIPM) Lampung pada tahun 2022. Kemudian pada tahun yang sama penulis melaksanakan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sinar Betung, Kecamatan Talang Padang, Kabupaten Tanggamus, Lampung.

## **MOTTO**

Jangan terlalu dikejar, jika memang jalannya pasti Allah memperlancar, karna yang menjadi takdirmu akan mencari jalannya untuk menemukanmu.

**(Ali bin Abi Thalib)**

Pendidikan merupakan senjata paling ampuh yang bisa kamu gunakan untuk merubah dunia.

**(Nelson Mandela)**

Hidup Cuma sekali, jangan menua tanpa arti.

**(Ridwan Kamil)**

Sesulit apapun keadaanmu, ajarilah hatimu agar selalu bisa menerima keadaan tanpa membenci.

**(Habib Umar bin Hafidz)**

Janganlah takut jatuh karna yang tidak pernah memanjatlah yang tidak pernah jatuh. Jangan takut gagal, karna yang tidak pernah gagal hanyalah orang orang yang tidak pernah melangkah. Dan jangan takut salah karna dengan kesalahan yang pertama kita dapat menambah pengetahuan untuk mencari jalan yang benar.

**(Buya Hamka)**

## PERSEMBAHAN

*Bismillahirrohmanirohim. Alhamdulillahrabbi 'Alamin. Allahuma sholli ala sayyidina Muhammad, wa'ala ali sayyidina Muhammad.*

Dengan mengucapkan puji syukur kepada Allah Yang Maha Kuasa atas berkat dan rahmat-Nya, saya mempersembahkan skripsi yang saya kerjakan dengan sepenuh hati ini kepada:

Kedua Orang Tuaku,

*Bapak Agus Wahyudiono dan Ibu Eva Yuliana*

yang telah memberikan saya cinta, kasih dan sayang tak terhingga serta tak kenal lelah dalam mendidik dan memberikan dukungan kepada saya sehingga skripsi ini dapat selesai tepat waktu.

Kakek dan Nenekku,

*Kakek Sukriono dan Almh. Nenek Rusmiati*

yang selalu memberikan semangat dan dukungan kepada saya hingga saya menyelesaikan pendidikan ini.

Bapak, Ibu Dosen Pembimbing dan Pembahas

*Prof. Dr. Sumardi, M.Si., Prof. Dr. Ir. Neti Yuliana, M.Si., dan Dr. Kusuma*

*Handayani, M.Si*

yang sudah sepenuh hati dalam membimbing dan membantu saya selama proses pembuatan skripsi ini hingga selesai.

## SANWACANA

*Bismillahirrahmaanirrahim, Alhamdulillah* rabbi 'Alamin, Puja dan puji syukur, penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat iman, islam, dan ihsan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi penulis yang berjudul "**Pengaruh Lama Fermentasi, Konsentrasi Gula Dan Konsentrasi Inokulum Terhadap Pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* Pada Media Fermentasi Pulpa Kakao**" dengan sebaik-baiknya dan tepat waktu. Shalawat serta salam tak lupa penulis curahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW. yang penulis harapkan syafaat di yaumul akhir kelak.

Dalam pengerjaan skripsi ini penulis menyadari telah melibatkan banyak pihak yang sangat membantu dalam banyak hal baik berupa kritik, saran maupun dukungan. Oleh sebab itu, disini penulis sampaikan rasa terima kasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Agus Wahyudiono dan Ibu Eva Yualiana yang merupakan sosok orang tua hebat dalam membesarkan penulis. Selalu memberikan kasih sayang yang tiada batas, memberikan dukungan moral, dan senantiasa mendoakan penulis hingga saat ini.
2. Kakek dan nenekku, Kakek Sukriono dan Almh. Nenek Rusmiati yang telah memberikan cinta dan kenangan manis serta selalu melangitkan doa untuk penulis.
3. Adik adikku, Syeikhu Ali Basfar dan Qudwah Al Hasan yang selalu gengsi mengutarakan rasa cintanya kepada penulis, tetapi terimakasih karna selalu kebersamai penulis disetiap langkah kehidupan ini.

4. Seluruh keluarga besar penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih telah mendukung penulis hingga akhir dan selalu merayakan keberhasilan kecil yang penulis lakukan.
5. Bapak Prof. Dr. Sumardi, M.Si selaku Pembimbing 1 yang dengan sepenuh hati dan penuh kesabaran dalam membimbing, memberikan ilmu-ilmu yang bermanfaat, memotivasi, serta memberikan kritik dan saran yang membangun selama penulis menyusun skripsi ini.
6. Ibu Prof. Dr. Ir. Neti Yuliana, M.Si sebagai Pembimbing 2 yang telah membimbing penulis dengan baik dan sepenuh hati, serta meluangkan waktunya untuk membantu penulis dalam membantu skripsi ini.
7. Ibu Dr. Kusuma Handayani, M.Si selaku Pembahas yang telah banyak memberikan ilmu-ilmu yang bermanfaat, memotivasi penulis, serta memberikan kritik dan saran yang membangun sehingga penulisan skripsi ini terlaksana dengan baik.
8. Ibu Dra. Yulianty M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu menyemangati penulis untuk menyelesaikan pembuatan skripsi ini
9. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A.IPM. selaku Rektor Universitas Lampung.
10. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
11. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
12. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Lampung
13. Ibu Oni Mastuti, S.Si. selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
14. Bapak dan Ibu Dosen serta seluruh Staff Jurusan Biologi yang tidak dapat penulis sebut satu persatu.
15. Teman-teman satu penelitian, Ayuni, Roni, Emilia, Salimah, Mia, Syifa, Aminudin dan Zahwa yang selalu membantu dan memberikan semangat kepada penulis selama melaksanakan penelitian.

16. Teman-teman ROCKMO, Pio, Ahok, Ewok, Combro, Kepin dan Ranga yang selalu menghibur dan menemani penulis dalam proses pengerjaan skripsi ini.
17. Teman teman kuliahku, Faninda Dikna, Yolanda Nababan, Ayu Fikri, Tarisalivia, Khairunnisa, Intan kartika dan Goniatur yang turut membantu, memotivasi dan memberikan semangat kepada penulis selama masa perkuliahan.
18. Teman teman virtual, Aulia Fransiska dan Ibnu Dhiyaul Haq, yang selalu mendengarkan keluh kesah penulis, menghibur penulis disaat saat sulit, memberikan dukungan hingga proses penulisan skripsi ini terselesaikan.
19. Teman-teman KKN Sinar Betung, Veronica, Prsilia, Iwan, Kisy, Cici, Adi, Fahri, Dendi, Rewi, dan Nevi yang telah memberikan warna dan pengalaman dihari hari penulis
20. Seluruh teman-teman Angkatan 2019 yang telah sama-sama berjuang sampai saat ini.
21. Untuk seseorang yang belum bisa dituliskan namanya dengan jelas disini. Terimakasih sudah menjadi sumber motivasi penulis dalam menyelesaikan tulisan ini sebagai salah satu upaya untuk memantaskan diri.
22. Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih kepada diri sendiri karena telah bertanggung jawab untuk menyelesaikan apa yang telah dimulai. Terimakasih karna terus berusaha dan tidak menyerah, dan bisa melewati badai sendirian. Ini merupakan pencapaian yang patut dibanggakan untuk diri sendiri. Terimakasih sudah bertahan.

## DAFTAR ISI

### Halaman

<b>ABSTRAK .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>PERSETUJUAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>MENGESAHKAN.....</b>	<b>iv</b>
<b>SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI .....</b>	<b>v</b>
<b>RIWAYAT HIDUP .....</b>	<b>vi</b>
<b>MOTTO .....</b>	<b>vii</b>
<b>PERSEMBAHAN.....</b>	<b>viii</b>
<b>SANWACANA .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>xv</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan.....	2
1.3 Kerangka pikir.....	3
1.4 Hipotesis .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Kakao.....	4
2.2 Fermentasi .....	6
2.3 Faktor Yang Berpengaruh Terhadap Fermentasi .....	7
2.3.1 Derajat keasaman/pH.....	7
2.3.2 Suhu .....	8
2.3.3 Media Pertumbuhan (Substrat).....	8
2.3.4 Cemaran Mikroorganisme .....	8
2.3.5 Lama Fermentasi .....	9
2.3.6 Mikroorganisme .....	9
2.4 <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	9
<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>12</b>
3.1 Waktu dan tempat.....	12
3.2 Alat dan Bahan .....	12
3.3 Rancangan penelitian.....	13
3.4 Diagram Alir Penelitian.....	15
3.5 Prosedur Penelitian.....	16

3.5.1	Pembuatan Stok Media <i>Potato Dextrose</i> Agar (PDA) dan <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB) .....	16
3.5.2	Persiapan Medium Pulpa Kakao .....	17
3.5.3	Isolasi khamir <i>Saccharomyces boulardii</i> dari Kapsul Suplemen ..	18
3.5.4	Pembuatan Starter <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	19
3.5.5	Penambahan Konsentrasi Gula pada Media .....	19
3.5.6	Penambahan Inokulum dan Lama Fermentasi .....	19
3.6	Metode Uji.....	19
3.6.1	Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Saccharomyces Boulardii</i> .....	19
3.6.2	Perhitungan Populasi Mikroba .....	20
3.6.3	Pengukuran pH .....	21
3.6.4	Pengukuran Konsentrasi Larutan (°Brix) .....	21
3.6.5	Pengujian Aktivitas Anti Bakteri.....	22
3.6.6	Perhitungan Zona Hambat yang Terbentuk.....	23
<b>IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>24</b>
4.1	Isolasi dan Karakterisasi <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	24
4.2	Kurva Pertumbuhan Sel Khamir Pada Media <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB) .....	25
4.3	Pertumbuhan Sel Khamir Pada Media Pulpa Kakao .....	28
4.4	Pengukuran pH Pada Media Pulpa Kakao.....	33
4.5	Pengujian Derajat Brix Pada Fermentasi Pulpa Kakao .....	37
4.6	Pengujian Antibakteri Pada Media Pulpa Kakao .....	42
4.7	Optimasi Perlakuan Terbaik Pada Fermentasi Pulpa Kakao .....	48
<b>V.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>49</b>
5.1	Kesimpulan.....	49
5.2	Saran.....	49
 <b>DAFTAR PUSTAKA</b>		

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
Tabel 1. Hasil Desain Respon Surface .....	13
Tabel 2. Desain percobaan 2 <sup>3</sup> faktorial dengan 3 variabel bebas.....	14
Tabel 3. Hasil karakterisasi khamir <i>Saccharomyces boulardii</i> .....	24
Tabel 4. Tampilan makroskopis dan mikroskopis <i>Saccharomyces boulardii</i>	25
Tabel 5. Total sel khamir pada masa inkubasi 0 – 28 jam .....	25
Tabel 6. Hasil Respon Total Khamir.....	29
Tabel 7. Model Linear Total Khamir dari Anova .....	30
Tabel 8. Hasil Respon Pengujian pH .....	33
Tabel 9. Model Quadratic pH dari Anova.....	35
Tabel 10. Hasil Respon Pengujian °Brix.....	38
Tabel 11. Model Linier °Brix dari Anova .....	39
Tabel 12. Hasil Respon Pengujian Anti Bakteri .....	43
Tabel 13. Model Quadratic anti bakteri dari Anova .....	44

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
Gambar 1. Morfologi kakao (Sumber: Unair news) .....	5
Gambar 2. Cairan pulpa kakao (Sumber: <a href="http://www.foodconnection.com">www.foodconnection.com</a> ) .....	6
Gambar 3. <i>Saccharomyces boulardii</i> pada mikroskop .....	11
Gambar 4. Diagram alir pengujian lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan <i>Saccharomyces boulardii</i> pada media fermentasi pulpa kakao.....	16
Gambar 5. Bilik hitung haemositometer (Sumber: DocPlayer.info).....	20
Gambar 6. Alat ukur pH meter (Dokumentasi Pribadi) .....	21
Gambar 7. Alat ukur °Brix (Dokumentasi Pribadi).....	22
Gambar 8. Penyaringan pulpa kakao menggunakan syringe filter (Dokumentasi Pribadi) .....	22
Gambar 9. Kurva pertumbuhan khamir pada media PDB .....	26
Gambar 10. Kontur respon lama fermentasi dan gula (a) kontur respon lama fermentasi dan inokulum (b) .....	31
Gambar 11. Kontur respon lama fermentasi dan gula (a) kontur respon lama fermentasi dan inokulum (b) .....	36
Gambar 12. Kontur respon °brix pada lama fermentasi dan gula (a), lama fermentasi dan inokulum (b) .....	40
Gambar 13. Kontur respon anti bakteri pada lama fermentasi dan gula (a), lama fermentasi dan inokulum (b) .....	45
Gambar 14. Kombinasi formula optimum minuman probiotik dengan waktu lama fermentasi, penambahan gula dan inokulum .....	48

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan komoditas perkebunan andalan yang terus dipacu pengembangannya untuk memenuhi kebutuhan beberapa industri dalam negeri seperti industri makanan dan minuman. Pengolahan kakao pada esensinya adalah usaha untuk memproses buah kakao menjadi biji kakao kering untuk dimanfaatkan menjadi sebuah produk. Pulpa kakao merupakan limbah hasil fermentasi biji kakao, yang mengandung asam asetat atau asam cuka, asam laktat dan alkohol. Asam-asam organik tersebut terbentuk dari fermentasi gula yang terkandung dalam pulpa kakao. Pulpa 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% (Lopez, 1986). Selama fermentasi dapat dihasilkan 15-20% limbah cairan pulpa dari berat biji kakao yang difermentasi (Ganda-Putra dkk., 2008). 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 bagi lingkungan disekitarnya. Padahal asam asetat sebagai salah satu kandungan cairan pulpa mempunyai nilai ekonomis yang tinggi.

*Saccharomyces boulardii* merupakan spesies khamir yang dikenal karena memiliki sifat probiotik seperti mengobati gastroenteritis yang disebabkan oleh bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella* sp (McFarland, 2007). Selain itu khamir ini memiliki beberapa nilai tambahan seperti efek menguntungkan terhadap patogen enterik, termasuk produksi senyawa yang menetralkan racun mikroba, pencegahan pelekatan bakteri dan translokasi dalam sel epitel usus dan modulasi jalur sinyal sel inang yang terkait dengan respon pro-inflamasi pada infeksi bakteri (Jenabian, *et al.*, 2010). Karakteristik dari *Saccharomyces*

*boulardii* ialah memiliki suhu pertumbuhan optimal 37 °C tetapi suhu maksimum yang dapat ditoleransi adalah 55 – 56 °C, dapat menoleransi konsentrasi etanol sekitar 20%, serta mampu tumbuh pada lingkungan yang sangat asam dengan nilai pH di atas 2. karena kemampuannya untuk bertahan hidup di lingkungan asam, ia dapat melewati sistem pencernaan tanpa berubah (Du, L, *et al.*, 2012)

Selain sifat probiotik yang dikaitkan dengan *Saccharomyces boulardii*, penelitian sebelumnya menunjukkan potensi penggunaan khamir ini dapat digunakan dalam pengembangan produk makanan fungsional (Sarwar, *et al.*, 2019). Diantara makanan yang paling banyak diteliti dengan khamir ini adalah produk susu (Zamora, *et al.*, 2015), jus buah dan minuman fermentasi (Degirmencioglu, *et al.*, 2016), dan sereal kacang-kacangan. Namun, jumlah publikasi yang terkait dengan aplikasi *Saccharomyces boulardii* menggunakan pulpa kakao sebagai starter fermentasi dengan tambahan starter yang bervariasi masih sedikit referensinya.

Dengan adanya penelitian mengenai pengaruh lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* sebagai starter fermentasi dari pulpa kakao, dapat dijadikan dasar untuk mengetahui titik optimum dari masing masing variabel yang diamati. Dalam penentuan titik optimasi menggunakan metode RSM (Metodologi Response surface). Menurut Trihaditia (2015) RSM merupakan suatu strategi percobaan yang berguna jika respon dipengaruhi beberapa faktor. Tujuan penggunaan RSM ini adalah untuk mencari respon optimum. RSM mencakup masalah seperti pemilihan rancangan percobaan yang cocok untuk optimasi dan metode penelusuran ruang faktor untuk mencapai daerah optimum dengan cepat.

## **1.2 Tujuan**

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Mengetahui pengaruh lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* pada media fermentasi pulpa kakao

2. Menentukan titik optimum lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan *Saccharomyces boulardii*

### 1.3 Kerangka pikir

Pulpa kakao merupakan selaput lendir berwarna putih yang membungkus biji kakao. Komposisi pulpa kakao diantaranya mengandung air 80 - 90%, albuminoid 0,5-0,7%, glukosa 8 -13%, asam yang tidak menguap 0,2 - 0,4%, besi oksidasi 0,03%, sukrosa 0,4 - 1%, garam-garam 0,4-0,45%, dan sedikit pati (Nasution, 1976). Komposisi pulpa yang demikian merupakan media pertumbuhan yang baik bagi mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi.

*Saccharomyces boulardii*. merupakan salah satu probiotik yang sering digunakan untuk mengobati dan mencegah penyakit yang menyerang saluran pencernaan. Pada penelitian ini khamir *S. boulardii* diterapkan pada media pulpa kakao dikarenakan pulpa kakao secara kimia dan fisik merupakan medium yang ideal untuk pertumbuhan khamir yang tumbuh pada kondisi anaerobic. Khamir akan bertambah jumlahnya selama 12 jam pertama fermentasi kemudian konstan pada 12 jam berikutnya (Ostovar dan Keeny, 1973) dalam (Putih, 2007). Reaksi pembentukan alkohol ini menghasilkan sejumlah besar karbondioksida. Segera setelah proses fermentasi dimulai, pulpa mulai pecah yang biasa terjadi karena tekanan mekanis atau perubahan-perubahan enzimatik (Wahyudi, *et al.*, 2008)

### 1.4 Hipotesis

1. Pengamatan mengenai pengaruh konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap lama fermentasi dapat menjadi acuan pertumbuhan *Saccharomyces boulardii*
2. Terdapat titik optimasi terbaik dengan variabel lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum pada fermentasi pulpa kakao.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kakao

kakao merupakan satu-satunya di antara 22 jenis marga *Theobroma*, suku Sterculiaceae yang diusahakan secara komersial. Menurut Tjitrosoepomo (1988) sistematika tanaman ini sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Division	: Spermatophyta
Sub-division	: Angiospermae
Class	: Dicotyledoneae
Sub-class	: Dialypetalae
Order	: Malvales
Family	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Species	: <i>Theobroma cacao L</i>

Habitat asli tanaman kakao adalah hutan tropis dengan naungan pohon-pohon yang tinggi, curah hujan tinggi, suhu sepanjang tahun relatif sama, serta kelembaban tinggi yang relatif tetap. Dalam habitat seperti itu, tanaman kakao akan tumbuh tinggi tetapi bunga dan buahnya sedikit. Jika dibudidayakan di kebun, tinggi tanaman umur tiga tahun mencapai 1,8 sampai 3 m dan pada umur 12 tahun dapat mencapai 4,5 sampai 7 meter. Tinggi tanaman tersebut beragam, dipengaruhi oleh intensitas naungan serta faktor-faktor tumbuh yang tersedia. Tanaman kakao bersifat dimorfisme, artinya mempunyai dua bentuk tunas vegetative. Tunas yang arah pertumbuhannya ke atas disebut dengan tunas ortotrop atau tunas air (wiwilan atau chupon), sedangkan tunas yang arah pertumbuhannya ke samping disebut dengan plagiotrop (Prastowo, 2010).



Gambar 1. Morfologi kakao (Sumber: Unair news)

Buah kakao secara garis besar terdiri atas tiga bagian yaitu kulit, plasenta (pulp), dan biji. ketiga bagian tersebut selama ini yang dimanfaatkan sebagai komoditas ekspor hanya keping biji, sedangkan yang lainnya belum dimanfaatkan secara optimal dan menjadi limbah pertanian yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan. Kulit buah kakao adalah limbah dengan proporsi terbesar yang dihasilkan. Kulit biji diperoleh dari pengolahan biji yang besarnya sekitar 10% dari berat kakao, sedangkan pulpa kakao adalah cairan dari pelepasan jaringan halus yang membungkus biji kakao (plasenta) pada proses fermentasi biji kakao (Murni, *et al.*, 2012).

Pulpa yang dihasilkan dari fermentasi biji kakao dapat menimbulkan masalah bagi lingkungan disekitar areal pengolahan. Pulpa kakao yang dibiarkan terbuang akan menjadi limbah sehingga dapat menimbulkan dampak yang besar apabila tidak segera ditangani. Limbah pulpa akan difermentasi mikroorganisme yang dapat oleh menimbulkan penyakit. Selain itu, limbah pulpa kakao juga dapat menyebabkan pencemaran udara akibat timbulnya bau asam dan tidak sedap yang disebabkan oleh aktivitas mikrobia yang menghasilkan gas ammonia (Indriani, 2004). Gas ammonia menghasilkan bau yang dapat merusak sistem pernapasan manusia jika dihirup secara terus menerus. Pulpa biji kakao ini dapat diolah lebih lanjut menjadi sebuah produk yang bernilai seperti dengan mengolahnya menjadi Nata De *Cacao* (Nurfaillah, 2018), pembuatan selai (Putu, 2015) dan produksi bioetanol (Lisma dan Sri, 2015)

Komposisi pulpa kakao diantaranya mengandung gula 12-15%, 5-7% pektin, 0,8-1,5% asam tidak menguap dan 0,1-0,5% protein (Hidayat, 1995). Komposisi pulpa yang demikian merupakan media pertumbuhan yang baik bagi mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi (Bintoro, 1977).



Gambar 2. Cairan pulpa kakao (Sumber: [www.foodconnection.com](http://www.foodconnection.com))

## 2.2 Fermentasi

Fermentasi merupakan suatu proses perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Fermentasi berhubungan dengan proses produksi produk dengan menggunakan mikroorganisme sebagai biokatalis (Riadi, 2007). Mikroba yang pada umumnya terlibat dalam fermentasi adalah bakteri, khamir, dan kapang. Proses fermentasi dibutuhkan starter sebagai mikroba yang akan ditumbuhkan dalam substrat. Starter merupakan populasi mikroba dalam jumlah dan kondisi fisiologis yang siap diinokulasikan pada media fermentasi (Prabowo, 2011). Proses optimum fermentasi tergantung pada jenis organismenya. Hidayat dan Suhartini (2013) menyatakan bahwa faktor yang mempengaruhi proses fermentasi adalah suhu, pH awal fermentasi, inokulum, substrat dan kandungan nutrisi medium.

Fermentasi terbagi menjadi dua, yaitu fermentasi aerob dan anaerob. Fermentasi aerob adalah fermentasi yang pada prosesnya memerlukan oksigen. Semua organisme untuk hidupnya memerlukan sumber energi yang diperoleh dari hasil metabolisme bahan pangan, dimana organisme itu berada. Bahan energi yang paling banyak digunakan mikroorganisme untuk tumbuh adalah glukosa. Dengan adanya oksigen, maka mikroorganisme dapat mencerna glukosa, menghasilkan

air, karbondioksida dan sejumlah besar energi. Sedangkan fermentasi anaerob adalah fermentasi yang pada prosesnya tidak memerlukan oksigen. Beberapa mikroorganisme dapat mencerna bahan energinya tanpa adanya oksigen, jadi, hanya sebagian bahan energi itu dipecah yang menghasilkan sebagian dari energi, karbondioksida dan air, termasuk sejumlah asam laktat, asetat, etanol, asam volatile, alkohol dan ester. Terdapat juga fermentasi semi aerob yaitu fermentasi yang tidak memerlukan oksigen sepenuhnya (Bachruddin, 2018).

### **2.3 Faktor Yang Berpengaruh Terhadap Fermentasi**

Belitz dan Grosch (1987) menyatakan bahwa fermentasi pulpa kakao segar oleh khamir dan bakteri akan menghasilkan cairan pulpa yang berwarna keruh. Menurut Agyeman dan Oldham (1986) cairan pulpa ini mempunyai pH 3,4-7,0 dan menurut Effendi (1995) cairan pulpa segar mengandung gula 12-15%, 5-7% pektin, 0,8-1,5% asam tidak menguap dan 0,1-0,5% protein. Seperti yang telah dijelaskan, fermentasi dapat dilakukan dalam lingkungan yang terkendali. Hal ini disebabkan karna lingkungan berpengaruh terhadap aktivitas mikroba yang dapat memengaruhi hasil atau produk akhir. Adapun faktor-faktor yang dapat dikendalikan antara lain

#### **2.3.1 Derajat keasaman/pH**

Merupakan salah satu faktor yang perlu untuk diperhatikan pada saat proses fermentasi. Pertumbuhan khamir sangat dipengaruhi oleh pH dan penggunaan pH optimum sangat disarankan agar fermentasi dapat berlangsung lebih cepat. pH optimum dapat berbeda-beda tergantung khamir yang digunakan (Aprilia, *et al.*, 2021).

Dalam proses fermentasi, pH merupakan variabel pertumbuhan mikroorganisme yang sangat penting, karena mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada kisaran pH tertentu. Untuk *S. boulardii*, pertumbuhan yang optimal berlangsung dalam media dengan pH 4,5-5,5 (Moradi, *et al.*, 2018) selain itu, mikroorganisme juga

memerlukan substrat yang mengandung nutrisi sesuai dengan kebutuhan yang diperlukan untuk pertumbuhannya (Subekti, 2006).

### **2.3.2 Suhu**

Suhu fermentasi mempengaruhi lama fermentasi karena pertumbuhan khamir dipengaruhi suhu lingkungan fermentasi. Khamir memiliki kriteria pertumbuhan yang berbeda-beda (Azizah, *et al.*, 2012). Contoh pengaruh suhu pada proses fermentasi yaitu pada penelitian yang dilakukan oleh Kumalasari (2011), yaitu *Saccharomyces* akan tumbuh optimal dalam kisaran suhu 30 – 35 °C dan puncak produksi alkohol dicapai pada suhu 33 °C. Jika suhu terlalu rendah, maka fermentasi akan berlangsung secara lambat dan sebaliknya jika suhu terlalu tinggi maka mikroba tersebut akan mati sehingga menyebabkan proses fermentasi tidak dapat berlangsung.

### **2.3.3 Media Pertumbuhan (Substrat)**

Media pertumbuhan merupakan salah satu faktor penting yang diperlukan untuk menumbuhkan dan mempelajari sifat-sifat mikroorganisme. Media harus mencukupi nutrisi, sumber energi dan kondisi lingkungan tertentu (Aini & Rahayu, 2015). Khamir biasanya menggunakan glukosa sebagai sumber karbon. Namun, ketika glukosa tidak tersedia, sumber karbon yang digunakan untuk energi metabolisme dan biomassa seluler adalah gula alternatif seperti galaktosa, sukrosa, dan maltosa serta karbon nonsugar seperti etanol, laktat, gliserol, dan oleat (Bernard dkk, 2009).

### **2.3.4 Cemaran Mikroorganisme**

Cemaran mikroorganisme dilakukan dengan pengendalian terhadap mikroorganisme lain, baik patogen maupun tidak, yang dapat mengganggu atau menghambat proses fermentasi yang mengakibatkan khamir mati dan fermentasi tidak berjalan dengan sempurna (Winarno, 1974). Pencegahan cemaran dapat dikendalikan dengan pengendalian suhu, pH, aktivitas air, nutrient, bahan kimia,

maupun iradiasi. Pada umumnya, proses pengendalian terhadap cemaran yang seringkali dilakukan adalah dengan pemanasan, baik itu menggunakan sterilisasi komersial maupun pasteurisasi. Pemilihan biasanya didasarkan atas sifat bahan yang digunakan

### **2.3.5 Lama Fermentasi**

Faktor lain yang sangat penting dalam proses fermentasi adalah waktu. Waktu fermentasi merupakan variabel yang berkaitan dengan fase pertumbuhan populasi khamir. Hal ini sesuai dengan pendapat Mubin dan Zubaidah (2015) bahwa khamir akan tumbuh subur pada kondisi suhu normal yaitu 25-30 °C sehingga populasi khamir yang dihasilkan tidak berbeda terlalu jauh. Populasi khamir akan terus tumbuh sampai pada tahap jenuh yaitu dimana jumlah makanan yang ada sama dengan jumlah sel khamir yang ada. Kondisi stasioner ini akan berubah menjadi kematian yang dipercepat apabila lama fermentasi diperpanjang, dimana fermentasi meningkatkan produksi gas CO<sub>2</sub> sehingga khamir tidak tumbuh.

### **2.3.6 Mikroorganisme**

Fermentasi membutuhkan mikroba sebagai pelaku utama. Pemilihan mikroorganisme yang tepat penting dilakukan untuk efisiensi proses fermentasi (kecepatan dan efisiensi penggunaan nutrient) dan arah hasil yang diinginkan. Sebagai contoh dalam fermentasi alkohol, umumnya menggunakan khamir dikarenakan khamir dapat mengonversi gula menjadi alkohol dengan adanya enzim zimase (Azizah, *et al.*, 2012).

## **2.4 *Saccharomyces boulardii***

*Saccharomyces boulardii* merupakan salah satu probiotik yang paling efektif untuk membantu mencegah atau mengobati penyakit. Sifat *Saccharomyces boulardii* adalah non-patogen yang bermanfaat banyak dalam saluran usus. *Saccharomyces boulardii* terisolasi dari kulit leci dan buah manggis yang tumbuh di kawasan Indochina. *Saccharomyces boulardii* memiliki taksonomi, fisiologis, metabolik

dan karakter genetik yang khas, yaitu dapat 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 (indah, *et al.*, 2015)

*Saccharomyces boulardii* bekerja dalam berbagai cara di dalam usus, tergantung pada jenis agen infeksi atau proses inflamasi yang menstimulasi sel usus. Dalam beberapa kasus infeksi diare, khamir ini akan berkompetisi dengan organisme yang menginfeksi dan khamir ini menang. Studi eksperimen memperlihatkan hasil bahwa *Saccharomyces boulardii* mempunyai sifat anti mikroba, sama baiknya dengan anti inflamasi dan anti racun (Vineeth, *et al.*, 2017). Mekanisme yang paling berpengaruh dari *Saccharomyces boulardii* adalah dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang mengandung racun, anti-*inflammatory* dan banyaknya efek stimulatory pada mukosa usus. *Saccharomyces boulardii* menginaktivasi racun bakteri, menghambat racun yang mengikat pada reseptor usus dan mengurangi toksin yang disebabkan peradangan (Nikmatus, 2018)

*Saccharomyces boulardii* tidak melakukan reproduksi spora atau yang disebut askospora dan tidak menggunakan gula galaktosa. Hal ini yang menyebabkan khamir tersebut menjadi sangat tahan terhadap panas dan asam. *Saccharomyces boulardii* adalah uniseluler (bersel satu) dan berbentuk globuler, bereproduksi dengan tunas yang akan meninggalkan luka pada permukaannya ketika tunas tersebut keluar (Umadiyah, *et al.* 2014)

*Saccharomyces boulardii* dicirikan sebagai spesies yang terpisah dari *Saccharomyces cerevisiae* karena tidak mencerna galaktosa dan tidak mengalami sporulasi. Urutan genomiknya, *Saccharomyces boulardii* memiliki 16 kromosom, plasmid lingkaran 2 mikron, dan diploid dengan gen untuk kedua jenis perkawinan. Baik *Saccharomyces boulardii* dan *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan protein yang menghambat bakteri patogen dan racun, khususnya *pho8* dan *ysp3*. *Saccharomyces boulardii* mengkodekan tambahan

protein adhesi yang membantu mengikat dan menghentikan bakteri patogen yang menempel pada mukus (Cairan lengket dan tebal yang disekresikan oleh membran dan kelenjar mukosa) di usus. (Khatri, *et al.*, 2017)

*Saccharomyces boulardii* memerlukan suhu fermentasi sekitar 30 °C (Sassner, 2008). Proses fermentasi dipengaruhi oleh berbagai faktor yang harus dikontrol agar proses berlangsung optimal, antara lain suhu, pH, oksigen, dan substrat (Subekti, 2006). Dalam proses fermentasi, pH merupakan variabel pertumbuhan mikroorganisme yang sangat penting, karena mikroorganisme hanya dapat tumbuh pada kisaran pH tertentu. Untuk *Saccharomyces boulardii* pertumbuhan yang optimal berlangsung dalam media dengan pH 4.5 - 5.5. Pada pH di bawah 3, proses fermentasi alkohol akan berkurang kecepatannya (Buckle, *et al.*, 2007). selain itu, mikroorganisme juga memerlukan substrat yang mengandung nutrisi sesuai dengan kebutuhan yang diperlukan untuk pertumbuhannya.

Klasifikasi dari *Saccharomyces boulardii* menurut (Van and Yarow, 1984) yaitu:

Kingdom	: Fungi
Division	: Ascomycota
Sub-division	: Saccharomycotina
Class	: Saccharomycetes
Ordo	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Saccharomyces</i>
Species	: <i>Saccharomyces boulardii</i>



Gambar 3. *Saccharomyces boulardii* pada mikroskop  
(Sumber: Laboratoire Lescuyer)

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Lampung pada Maret – Juni 2023.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah timbangan analitik, autoclave, mikropipet 100-1000 µl, haemositometer, *Biosafety cabinet* (Mammert in30), *orbital shaker* (Gallenkap), *laminar air flow*, *centrifuge* (fisher scientific) oven, jarum ose, pH meter (*mediatech* digital), mikroskop binokuler (Nikon E Clips), kamera hp, *beaker glass*, corong, tabung reaksi, cawan petri, pipet tetes, pipet volume, *disposable syringe*, jarum suntik, tip, erlenmeyer, gelas ukur, bunsen, *hotplate*, stirer, *waterbath* (Unitronic) jangka sorong, aluminium foil, kasa, kapas, *tissue*, *cotton swab* steril, plastik wrap dan benang.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pulpa buah kakao, Kultur starter *Saccharomyces boulardii* (Swanson), isolat bakteri *Escherichia coli* yang diperoleh dari sediaan Lab Mikrobiologi FMIPA Unila, antibiotik *chloramphenicol* 100 mg/ 1000 ml (Sanbe), *streptomycine paper disk* (oxoid), gula pasir (Rose brand), kentang, media *Potato Dextrose Agar*, media *Potato Dextrose Broth* (PDB), media Nutrient Agar (Himedia), media Nutrient Broth (NB) aquadest, alkohol, dan spirtus.

### 3.3 Rancangan 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 gula dan konsentrasi inokulum. Percobaan ini menggunakan 3 variabel bebas yaitu lama fermentasi (0, 5, 12.5, 20, dan 25 jam), konsentrasi gula (1.6%, 2%, 2.5%, 3% dan 3.3%) dan konsentrasi inokulum (1%, 2%, 3.5%, 5% dan 6%) (Tabel 2). *Central Composite Design* menghasilkan *response surface* rancangan percobaan sebanyak 20 faktorial (Tabel 1). Selanjutnya diperoleh rancangan percobaan dengan menggunakan desain  $2^3$ . Parameter yang diamati yaitu total khamir, pH, °Brix dan pengujian anti bakteri. Hasil variabel respon selanjutnya dianalisis sidik ragamnya menggunakan program Desain Expert 12. Kecocokan dan kesuaian diuji dengan ANOVA.

Tabel 1. Hasil Desain Respon Surface

<b>Central Composite Design</b>	<b>Total</b>		<b>Total</b>
Factors	3	Replicates	1
Base runs	20	Total runs	20
Base blocks	1	Total blokcks	1
<b>Two-level factorial Full factorial</b>			
Cube points	14		
Center points in cube	6		
Axial points	6		
Center points in axial	0		
$\alpha: 1,681$			

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

Run	Lama fermentasi (jam)	Konsentrasi gula (%)	Konsentrasi 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
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	2.5	3.5
17	5	3	2
18	5	2	5
19	12.5	2.5	6
20	12.5	1.6	3.5

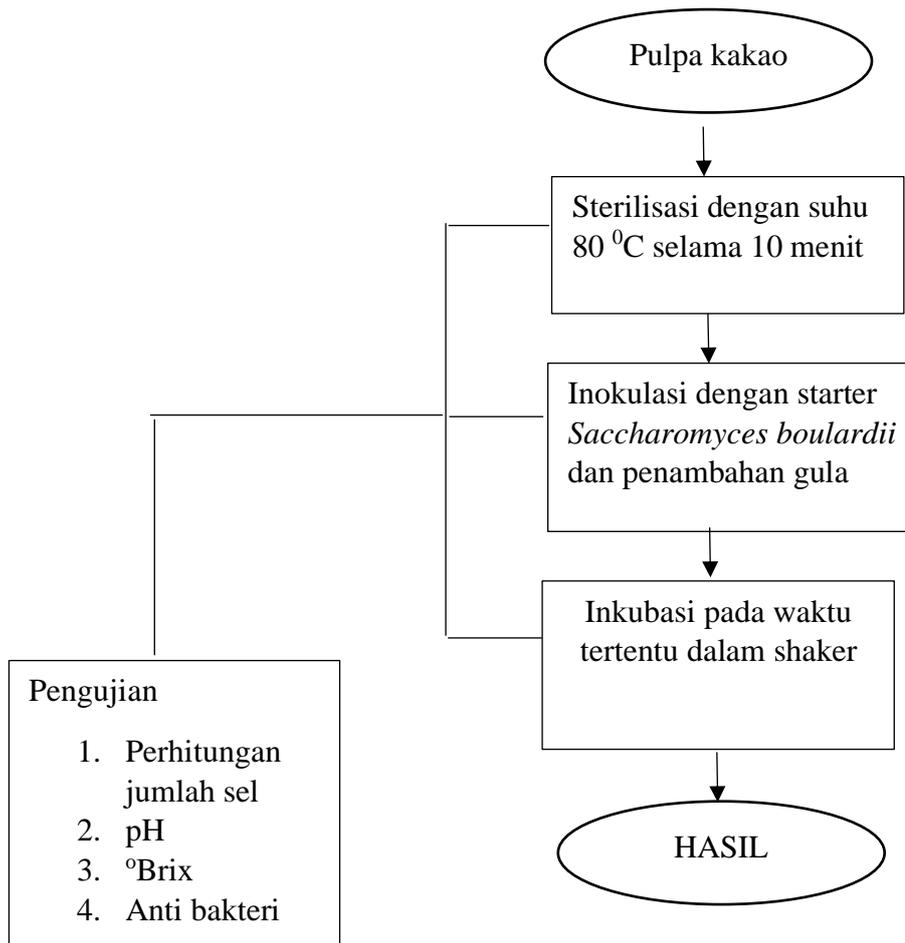
Data yang diperoleh diolah menggunakan *Software Design Expert 12* dengan tahapan: (1) menentukan jenis model, (2) analisis sidik ragam model terpilih, (3) menentukan persamaan model dan grafik, dan (4) optimasi formula. Analisis pemilihan model terhadap respon dilakukan berdasarkan jumlah kuadrat dari 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 dari masing-masing respon. Model yang baik memiliki nilai P 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 gula, 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 *desirability* maksimum. Nilai *desirability* merupakan nilai 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 Diagram Alir Penelitian**

Tahapan penelitian pengaruh lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* pada media fermentasi pulpa kakao dapat dilihat pada diagram alir berikut



Gambar 4. Diagram alir pengujian lama fermentasi, konsentrasi gula dan konsentrasi inokulum terhadap pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* pada media fermentasi pulpa kakao

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Pembuatan Stok Media *Potato Dextrose Agar (PDA)* dan *Potato Dextrose Broth (PDB)*

Media PDA sebanyak 1000 ml membutuhkan kentang sebanyak 200 gr, *dextrose* 20 gr, agar kering 15 gr, dan aquades 1000 ml (Himedia). Kentang dipotong kecil seperti dadu dan dimasukkan kedalam *beaker glass* yang sudah berisi akuades, lalu dipanaskan hingga mendidih sehingga tekstur kentang menjadi lunak. Air rebusan kentang dipisahkan serta tambahkan *dextrose* dan agar. Campuran bahan sebelumnya dipanaskan kembali diatas hotplate dan diaduk menggunakan

*magnetic stirrer* hingga larut, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer dan sterilisasi media menggunakan autoklaf selama 15 menit. Media yang telah steril kemudian ditambahkan dengan antibiotik kloramfenikol sebanyak 100 mg/1000 ml. Media siap digunakan dan dapat disimpan di kulkas untuk penggunaan berikutnya.

Selanjutnya untuk membuat media PDB 1000 ml dibutuhkan kentang sebanyak 200 gr, dextrose 20 gr dan akuades. kentang dipotong kecil-kecil seperti dadu dan dimasukkan kedalam *beaker glass* yang sudah berisi akuades. Kemudian dilakukan pemanasan hingga tekstur kentang menjadi lunak. Air rebusan kentang dipisahkan dan tambahkan dextrose. Media dimasukkan kedalam erlenmeyer dan sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit. Media yang telah steril kemudian ditambahkan dengan antibiotik kloramfenikol sebanyak 100 mg/1000 ml. Penggunaan media *broth* ini digunakan karna larutan lebih mudah diukur dan dipindahkan kedalam media pulpa kakao, selain itu media ini sangat mendukung pertumbuhan jamur dan khamir khususnya *Saccharomyces boulardii* karena tingkat keasaman yang rendah yaitu berkisar antara pH 4,5 sampai 5,6 sehingga dapat menghambat pertumbuhan dari suatu bakteri (Ismawati, 2016).

### **3.5.2 Persiapan Medium Pulpa Kakao**

Buah kakao dipetik dan dikumpulkan dari kebun petani di daerah Tanggamus, Lampung barat. Buah coklat dipilih yang sudah matang berwarna merah kekuningan. Pulpa kakao diambil dengan membuka kulit buah kakao dan diambil bagian isinya. Kemudian biji kakao dimasukkan ke dalam karung nilon bersih. Cairan yang keluar selama proses diambil dan ditampung pada wadah jerigen atau ember. Pulpa disimpan dalam jerigen yang tertutup dan dimasukkan kedalam *freezer*.



Gambar 5. Pulpa kakao (Sumber: Dokumentasi Pribadi)

### 3.5.3 Isolasi khamir *Saccharomyces boulardii* dari Kapsul Suplemen

Kapsul suplemen yang berisi *Saccharomyces boulardii* diambil secara aseptik didalam laminar air flow dan dilakukan metode sebaran diatas media potato dextrose agar (PDA) kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C. Isolat yang tumbuh dilakukan *streak* kuadran pada cawan petri dan dilakukan inkubasi kembali. Setelah dilakukan inkubasi, inokulasi khamir pada tabung reaksi untuk kultur stok.



Gambar 6. *Saccharomyces boulardii* dalam kapsul suplemen (Sumber: Dokumentasi pribadi).

### **3.5.4 Pembuatan Starter *Saccharomyces boulardii***

Pembuatan starter dimulai dari diambilnya koloni *Saccharomyces boulardii* yang telah distreak pada tabung reaksi dengan loop ose untuk diinokulasikan kedalam media PDB volume 150 ml dalam erlenmayer 250 ml. Inokulasi kultur sebanyak 3 ose dilakukan secara aseptis didalam laminar *air flow*. Starter dilakukan inkubasi dalam shaker selama 20 jam. Untuk melihat pertumbuhan khamir yang hidup dihitung menggunakan haemositometer.

### **3.5.5 Penambahan Konsetrasi Gula pada Media**

20 erlenmayer media pulpa kakao yang telah dipasteurisasi pada *waterbath* selama 10 menit di suhu 80 °C ditambahkan gula sebanyak 1,6%, 2%, 2,5%, 3% dan 3,3%. (Tabel.2)

### **3.5.6 Penambahan Inokulum dan Lama Fermentasi**

Media yang telah siap, ditambahkan dengan starter *Saccharomyces boulardii* yang diperoleh dari inkubasi media PDB sebanyak 1%, 2%, 3.5%, 5% dan 6% (Tabel. 2). Kemudian pulpa yang telah diberi starter diinkubasi selama 5 jam, 12,5 jam 20 jam dan 25 jam (Tabel.2)

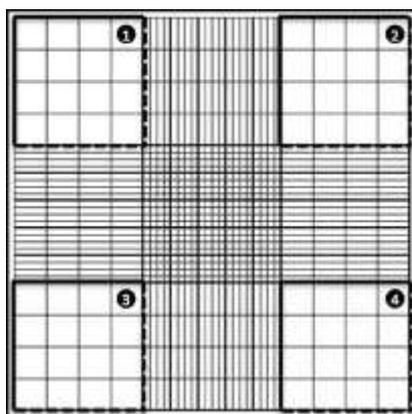
## **3.6 Metode Uji**

### **3.6.1 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Saccharomyces Boulardii***

Tahap ini bertujuan untuk mengetahui fase stationer dari khamir *Saccharomyces boulardii* sebagai dasar penentu lama waktu inkubasi produksi inokulum dalam shaker. Dilakukan pengamatan setiap 4 jam sekali pada media PDB dan dihitung jumlah sel. Hasilnya akan didata dan dibuat kurva pertumbuhan *Saccharomyces boulardii*.

### 3.6.2 Perhitungan Populasi Mikroba

Perhitungan mikroba menggunakan alat haemositometer. Sebelumnya permukaan hitung haemositometer dibersihkan menggunakan alkohol dan *tissue*, kemudian *cover glass* diletakkan diatas haemositometer. Sebanyak satu tetes suspensi pulpa diteteskan pada lekukan tepi kaca haemositometer dengan pipet dan dibiarkan sampai memenuhi ruang hitung dan ditambahkan pewarna *lactophenol cottonblue*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop pada perbesaran 40x kali dan dihitung jumlah sel pada 80 kotak kecil yang terletak di dalam kotak tengah yang berukuran 1 mm.



Gambar 5. Bilik hitung *haemositometer* (Sumber: DocPlayer.info)

Kerapatan sel dihitung dengan menggunakan rumus menurut Gabriel dan Riyatno (1989)

$$C = \frac{t}{(n \times 0.25)} \times 10^6$$

Keterangan:

C : Kerapatan sel per mL larutan

t : Jumlah total sel dalam kotak sampel yang diamati

n : Jumlah kotak sampel (5 kotak besar x 16 kotak kecil)

0,25 : Faktor koreksi penggunaan kotak sampel skala kecil pada hemasiometer

### 3.6.3 Pengukuran pH

Pengukuran pH diawali dengan mengkalibrasi pH meter menggunakan larutan pH buffer. Sebelum digunakan untuk mengukur pH pada pulpa kakao, elektroda pH meter yang telah dikalibrasi dibilas terlebih dahulu dengan aquades kemudian dikeringkan dengan tisu. Langkah ujinya dengan dicelupkan elektroda pH meter ke dalam larutan pulpa fermentasi dan tunggu hingga beberapa saat. Hasil dari nilai pH akan keluar pada layar.



Gambar 6. Alat ukur pH meter (Dokumentasi Pribadi)

### 3.6.4 Pengukuran Konsentrasi Larutan (°Brix)

Penentuan kadar °Brix digunakan untuk mengukur besarnya konsentrasi gula yang terkandung suatu larutan dengan menggunakan alat *hand refractometer*. *Hand refractometer* merupakan alat yang baik digunakan untuk meneliti nilai °Brix karena pengukurannya sederhana, lebih cepat dan akurat. Alat ini digunakan untuk mengukur konsentrasi suatu larutan dengan bantuan indeks bias atau refraksi cahaya. Sebelum melakukan pengukuran °Brix pulpa kakao, *refractometer* dikalibrasi terlebih dahulu dengan aquadest. Kemudian pulpa kakao diletakkan pada sensor *refractometer*. Pengukuran dimulai dengan menekan tombol *start* ditekan dan secara otomatis tampilan angka pada *refractometer* akan menunjukkan angka Brix (°) pulpa kakao yang diuji. Pengujian diulangi sebanyak 2 kali ulangan.



Gambar 7. Alat ukur °Brix (Dokumentasi Pribadi)

### 3.6.5 Pengujian Aktivitas Anti Bakteri

Pengujian anti bakteri menggunakan media nutrient agar (NA) untuk pertumbuhan bakteri *E. coli*. Media NA yang telah dibuat, dimasukkan kedalam cawan petri sebanyak 15 ml dan bakteri *E. coli* diswab diatas media tersebut. Letakan cakram berukuran 6 mm yang berisi larutan fermentasi pulpa kakao steril sebanyak 2 buah sebagai pengulangan dan 1 cakram antibiotik *streptomycine* sebagai kontrol positif. Pulpa kakao yang ingin dilakukan uji anti bakteri dicentrifuge dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit untuk diambil cairan natan dan disaring kembali dengan *cyringe filter* dengan ketebalan 200  $\mu\text{m}$ . Setelah disaring, cakram ditetesi dengan pulpa kakao yang telah diberikan perlakuan. Rendam cakram selama 15 menit, setelah itu letakan cakram diatas media NA dengan jarak antar cakram 3 cm dan jarak cakram dari tepi cawan sebesar 2 cm menggunakan pinset. Inkubasi selama 24 jam. Pertumbuhan zona hambat pulpa kakao fermentasi diamati dari zona bening yang terbentuk di sekeliling cakram dan diukur menggunakan jangka sorong.



Gambar 8. Penyaringan pulpa kakao menggunakan *syringe filter* (Dokumentasi Pribadi)

### 3.6.6 Perhitungan Zona Hambat yang Terbentuk

Zona hambat diukur dengan mengambil dua garis yang saling tegak lurus melalui titik pusat cakram. Diameter zona hambat horizontal, untuk garis pertama, garis kedua diameter zona hambat vertikal dan garis ketiga diameter kertas cakram. Jumlah diameter garis pertama dikurangi diameter garis ketiga ditambahkan dengan jumlah diameter garis kedua yang dikurangi diameter garis ketiga. Kedua hasil diameter garis tersebut dibagi dua, maka akan diperoleh luas diameter zona hambat (Andries, *et al.*, 2014). Diameter zona hambat dapat dikategorikan kekuatannya berdasarkan Greenwood (2000) kuat (zona hambat >20mm), sedang (zona hambat 10 – 15 mm) dan tidak ada zona hambat , 10 mm) (Alfath C, *et al.*, 2013).

$$L = \frac{(D1 - D3) + (D2 - D3)}{2}$$

Keterangan :

- L = Luas zona hambat
- D1 = Diameter zona hambat horizontal
- D2 = Diameter zona hambat vertikal
- D3 = Diameter Cakram

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapat pada penelitian ini adalah sebagai berikut

1. Pada variabel lama fermentasi mempengaruhi perhitungan total khamir. Variabel konsentrasi gula mempengaruhi pengujian °brix dan interaksi antara lama fermentasi dan konsentrasi inokulum mempengaruhi pengujian anti mikroba.
2. Solusi optimasi pada fermentasi pulpa kakao pada waktu fermentasi terbaik berkisar 20 jam, konsentrasi gula terbaik sebesar 2% dan konsentrasi inokulum sebesar 2% dengan memiliki nilai desirability yang tinggi sebesar 0,883

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penambahan lama waktu fermentasi untuk melihat pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* pada media pulpa kakao
2. Perlu dilakukan penyesuaian media agar pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* lebih baik

## DAFTAR PUSTAKA

- Agyeman, K., and Oldham, J. (1986). Utilization of Cocoa by Products as an Alternative Source of Energy. *Jurnal Biomass*, 10(4): 311-318.
- Aini, N. dan Rahayu, T., 2015. Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. *Jurnal Pangan dan Agorindustri*, 1(10): 13-19.
- Aini, N., dan Sofyan, I. (2017). Karakteristik Minuman Sari Buah Bligo (*Benicasa Hispida*) Dengan Penambahan Sukrosa pada Suhu Pasteurisasi yang Berbeda. *Doctoral dissertation*. Fakultas Teknik Unpas.
- Aprilia, V., Apriyanto, M., Fangohoi, L., Diba, D. F., Prayitno, S. H., Nurhayati, N., dan Sari, D. A. (2021). *Pangan Berbasis Fermentasi*. Yogyakarta.
- Azizah, N., Al – Baarri, A., 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*, 1(2): 72–77.
- Bachruddin, Z. (2018). *Teknologi Fermentasi pada Industri Peternakan*. UGM Press.
- Belitz, H. and W.N. Grosch. (1987). *Food Chemisty*. Springer-Verlag. Berlin
- Buckle, K. A, R. A. Edwards, G. H. Fleet dan M. Wootton. (1987). *Ilmu Pangan*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta (Diterjemahkan oleh H, Purnomo dan Adiono).
- Cinderela, N. K. D., Nocianitri, K. A., & Hatiningsih, S. Pengaruh Konsentrasi Sukrosa Terhadap Karakteristik Minuman Probiotik Sari Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) Terfermentasi dengan Isolat *Lactobacillus* sp. F213. *Jurnal ilmu dan teknologi pangan*, 11(2)
- Değirmencioğlu, N., Gürbüz, O., Herken, E. N., & Yıldız, A. Y. (2016). The Impact of Drying Techniques on Phenolic Compound, Total Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Oat Flour Tarhana. *Food Chemistry*, (194): 587-594.

- Du, L. P., Hao, R. X., Xiao, D. G., Guo, L. L., and Gai, W. D. (2012). Research on the Characteristics and Culture Conditions of *Saccharomyces boulardii*. *Advanced materials research*, 343, 594-598.
- Effendi, S., 1995. *Utilization of Cacao Sweetings for Nata Production Using Acetobacter Xylinum*. Menara Perkebunan. 63(1): 23–26.
- Gabriel, B., dan Riyanto, P. (1989). *Metarhizium Anisopliae (Metch) Sor: Taksonomi, Patologi, Produksi dan Aplikasinya*. Direktorat Perlindungan Tanaman Perkebunan, Departemen Pertanian. Jakarta.
- Hidayat, E. B. 1995. *Anatomi Tumbuhan Berbiji*. Bandung: ITB.
- Hidayat, N. M. C., dan Suhartini. (2013). *Pembuatan Pakan Ternak Fermentasi*. Andi. Jakarta.
- Indah H, Putri F, Utama GL. (2015). Preliminary Studies of Halophilic Yeasts Antimicrobial Activities Isolated from Cocoa Bean Pulp Towards *E. coli* and *Salmonella* Sp., *Int J. On Adv. Sci. Eng. and Information Technology*. 5(2): 107- 109
- Ismawati, N., dan Rahayu, T. (2016). Pemanfaatan Ubi Jalar Putih, Ubi Jalar Kuning, Dan Singkong Sebagai Media Alternatif Potato Dextrose Agar (PDA) Untuk Pertumbuhan *Aspergillus niger*. *Doctoral dissertation*. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Khatri, Indu., Tomar, Rajul., Ganesan, K., Prasad, G. S., Subramanian, Srikrishna. (2017). Complete Genome Sequence and Comparative Genomics of the Probiotic Yeast *Saccharomyces Boulardii*. *Scientific Reports*. 7(1)
- Kumalasari, I. (2011). *Pengaruh Variasi Suhu Inkubasi Terhadap Kadar Etanol Hasil Fermentasi Kulit dan Bonggol Nanas (Ananas sativus)*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Kusmarwati, A., dan Indriati, N. (2008). Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium Edule Reinw.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Vol*, 3(1).
- Kusumaningrum, A. P. (2011). *Kajian Total Bakteri Probiotik Dan Aktivitas Antioksidan Yoghurt Tempe Dengan Variasi Substrat*. Surakarta. UNS
- Leni Herliani Afrianti, L. H. A. (2013). Pengaruh Jenis Penstabil Dan Perbandingan Sukrosa dan Glukosa Terhadap Karakteristik Soft Candy Ekstrak Salak Bongkok (*Salacca edulis. Reinw cv. Bongkok*). *Doctoral dissertation*, Fakultas Teknik Unpas.

- Lestari, L. A., Harmayani, E., Utami, T., Mardika Sari, P., dan Nurviani, S. (2018). *Dasar-Dasar Mikrobiologi Makanan*. Gadjah Mada University Press.
- Lina, L., Rusmiyanto, E., dan Kurniatuhadi, R. (2021). Khamir Potensial Probiotik Hasil Isolasi dari Fermentasi Jus Jeruk Siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*). *Biologica Samudra*, 3(2), 115-132.
- Lopez, A.S. 1986. Chemical Change Occurring During the Processing of Cacao. *Proceeding of The Cacao Biotechnology Symposium*. Dept. of Food Science College of Agriculture, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA
- Maryana, *et al.*, 2020. Pengaruh Konsentrasi dan Jenis Ragi Pada Produksi Bioetanol dari Ampas Tebu. *Jurnal Agroindustri*, 10(1), 47–56
- McFarland, L.V. (2017). *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*. Elsevier. hlm. 145–164.
- Moradi R., Nosrati R., Zare H., Tahmasebi T., Saredi H., Owlia P. (2018). Skrining dan Karakterisasi Kriteria Probiotik In-Vitro Strain *Saccharomyces* dan *Kluyveromyces*. *Mikrobiol.* 10 123–131
- Morales, G., Sierra, P., Mancilla, Paredes, A., Loyola, L.A., Gallardo, O., and Borquez, J. (2003). Secondary Metabolites from Four Medicinal Plants from Northern Chile: Antimicrobial Activity and Biototoxicity Against *Artemia Salina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 48(2), 13-18.
- Moslehi-Jenebian, S., Pedersen, L.L. dan Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic & Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients*, 2(4), 449-73.
- Mubin, M. F dan E. Zubaidah. 2016. Studi Pembuatan Kefir Nira Siwalan (*Borassus Flabellifer* L.) Pengaruh Pengenceran Nira Siwalan dan Metode Inkubasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 4(1): 291-301
- Nasution, Z. 1976. *Pengolahan Cokelat*. Departemen Teknologi Hasil Pertanian. IPB-Press. Bogor
- Pereira, G., Miguel, M., Ramos, C., dan Schwan, R. (2012). Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains to Develop a Defined Starter Culture. *Applied and environmental microbiology*, 78(15), 5395-5405.
- Prabowo, B. (2011). *Statistik Tanaman Sayuran dan Buah Semusim Indonesia*. Jakarta. Indonesia.

- Riadi, R., Tawegoum, R., Rachid, A., and Chasseriaux, G. (2007). Decentralized Temperature Fuzzy Logic Control of a Passive Air Conditioning Unit. In 2007. *Mediterranean Conference on Control & Automation* (pp. 1-6). IEEE.
- Rodriguez Molina, M., and Chambi Rodriguez, A. D. (2019). Determination of the Microbial Growth Curve of *Saccharomyces Boulardii* in Tunta Chaska. *Fides Et Ratio-Revista De Difusión Cultural Y Científica De La Universidad La Salle En Bolivia*, 18(18), 201-214.
- Rohman, A. R., Dwiloka, B., dan Rizqiaty, H. (2019). Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Total Asam, Total Bakteri, Asam Laktat, Total Khamir dan Mutu Hedonik Kefir Air Kelapa Hijau (*Cocos nucifera*). *Jurnal Teknologi Pangan*, 3(1), 127-133.
- Sarwar, A., *et al.* (2019). Physicochemical and Microbiological Properties of Synbiotic Yogurt Made with Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* in Combination with Inulin. *Foods*, 8(10), 468.
- Sassner, P, C.G. Martensson, M. Galbe, and G. Zacchi. (2008). Steam Pretreatment of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Impregnated Salix for Production of bioethanol. *Bioresource technol.* 99(2008): 137-145.
- Sintasari, R. A., J. Kusnadi, D. W. Ningtyas. 2014. Pengaruh Penambahan Konsentrasi Susu Skim dan Sukrosa Terhadap Karakteristik Minuman Probiotik Sari Beras Merah. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3): 65-75.
- Sopandi T dan Wardah. (2014). *Mikrobiologi Pangan – Teori dan Praktik*. Yogyakarta: Penerbit Andi.
- Subekti H. 2006. *Produksi Etanol dari Hidrolisat Fraksi Selulosa Tongkol Jagung*. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor
- Suprihatin. (2010). *Teknologi Fermentasi*. Surabaya. UNESA University Press.
- Tjitrosoepomo., Gembong. (1988). *Taksonomi Tumbuhan (Spermathopyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Trihaditia, R. (2015). Penentuan Formulasi Optimum pada Pembuatan Minuman Fungsional Rambut Jagung dengan Penambahan Madu dan Jeruk Nipis Menggunakan Metode RSM (Response Surface Method). *Thesis*. Fakultas Teknologi Pangan Universitas Pasundan. Bandung.
- Umaiyah AS, Chairul, Yenti SR. (2014). Fermentasi Nira Nipah Skala 50 Liter Menjadi Bioetanol Menggunakan *Saccharomyces Cerevisiae*. *Jurnal Online Mahasiswa*. Fakultas Teknik Universitas Riau. Riau: Universitas Riau

- Vineeth Kumar, T. V., and Sanil, G. (2017). A Review of The Mechanism of Action of Amphibian Antimicrobial Peptides Focusing on Peptide-Membrane Interaction and Membrane Curvature. *Current Protein and Peptide Science*, 18(12), 1263-1272.
- Winarno, F. (1974). *Pangan, Gizi, Teknologi dan Konsumen*. PT Gramedia Pustaka Utama.
- Yunilas. 2022. *Cocktail Inokulum*. Medan. USU 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*. 3(2): 303- 312.
- Riadi, Z. O. F. (2016). Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Nilai PH, Total Asam, Jumlah Mikroba, Protein, dan Kadar Alkohol Kefir Susu Kacang Kedelai (*Glycine max* (l) merill). *Doctoral dissertation*, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Zamora-Vega, R., Martínez-Flores, H. E., Montañez-Soto, J. L., and Rodiles-López, J. O. (2015). Viabilidad de *Saccharomyces boullardii* en queso fresco bajo condiciones de acidez “in vitro”. *Nova scientia*, 7(15), 68-80