

**KARAKTERISTIK MINUMAN PROBIOTIK PULPA  
KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN KONSENTRASI  
GULA DAN KHAMIR *Saccharomyces boulardii* BERBEDA**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**NABILA RIZKA PUTRI APRI  
2014231003**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

## ABSTRACT

### CHARACTERISTICS OF COCOA PULP PROBIOTIC DRINK (*Theobroma cacao L.*) WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SUGAR AND YEAST *Saccharomyces boulardii*

By

NABILA RIZKA PUTRI APRI

Probiotic drinks can help gastrointestinal problems such as diarrhea. Utilizing cocoa pulp as a probiotic drink can be one way to increase the use and selling value of cocoa pulp. The aim of this research is to validate the best predicted results of previous research, to determine the physico-chemical, sensory and antimicrobial properties of cocoa pulp probiotic drinks using *Saccharomyces boulardii*. The research was carried out in 3 stages, namely, validating 4 formulas from the predicted values of previous research models, characterization, and determining the best formula using the AHP method. The four fermentation formulas observed were: A, B, C, D. The research results show that based on validation data using design expert 12, only formulation A has valid data. The characteristics of the four drink formulas are: (1) antimicrobial against gram negative (*E. coli*) 2.88-4.88 mm, (2) total yeast log 8,101-7,684 cells (cfu/ml) and (3) sensory score (acceptance overall) 2.43-3.35. There are two best treatments for cocoa pulp probiotic drinks using *Saccharomyces boulardii*, namely formula A and formula B.

**Keywords:** *probiotics, cocoa pulp (Theobroma cacao L), Saccharomyces boulardii, total yeast, antimicrobial.*

## ABSTRAK

### KARAKTERISTIK MINUMAN PROBIOTIK PULPA KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN KONSENTRASI GULA DAN KHAMIR *Saccharomyces boulardii* BERBEDA

Oleh

NABILA RIZKA PUTRI APRI

Minuman probiotik dapat membantu permasalahan gastrointestinal seperti diare. Pemanfaatan pulpa kakao sebagai minuman probiotik dapat menjadi salah satu cara untuk meningkatkan nilai guna dan jual dari pulpa kakao. Tujuan penelitian ini adalah melakukan validasi terhadap hasil prediksi terbaik penelitian sebelumnya, mengetahui sifat fisiko-kimia, sensori, dan antimikroba dari minuman probiotik pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii*. Penelitian dilakukan dengan 3 tahap yaitu, validasi 4 formula dari nilai prediksi model penelitian sebelumnya, melakukan karakterisasi, dan penentuan formula terbaik dengan metode AHP. Empat formula fermentasi yang diamati adalah : A, B, C, D. Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan data validasi menggunakan *design expert 12*, hanya formulasi A yang memiliki data valid. Karakterisasi keempat formula minuman tersebut yaitu: (1) antimikroba terhadap gram negatif (*E. coli*) 2,88-4,88 mm, (2) total khamir log 8,101-7,684 cell (cfu/ml) dan (3) skor sensori (penerimaan keseluruhan) 2,43-3,35. Terdapat dua perlakuan terbaik untuk minuman probiotik pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii* yaitu formula A dan formula B.

**Kata kunci:** probiotik, pulpa kakao (*Theobroma cacao* L), *Saccharomyces boulardii*, total khamir, antimikroba

**KARAKTERISTIK MINUMAN PROBIOTIK PULPA  
KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN KONSENTRASI  
GULA DAN KHAMIR *Saccharomyces boulardii* BERBEDA**

Oleh

**NABILA RIZKA PUTRI APRI**

Skripsi

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

pada

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



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

Judul Skripsi

**: KARAKTERISTIK MINUMAN  
PROBIOTIK PULPA KAKAO  
(*Theobroma cacao* L.) DENGAN  
KONSENTRASI GULA DAN  
KHAMIR *Saccharomyces  
boulardii* BERBEDA**

Nama Mahasiswa

**: Nabila Rizka Putri Apri**

Nomor Pokok Mahasiswa

**: 2014231003**

Program Studi

**: Teknologi Industri Pertanian**

Fakultas

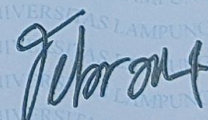
**: Pertanian**

**MENYETUJUI**

**1. Komisi Pembimbing**

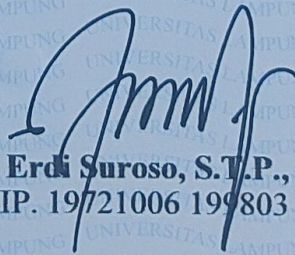


**Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D.**  
NIP. 196507251992032002



**Ir. Fibra Nurainy, M.T.A.**  
NIP. 19680225 199603 2 001

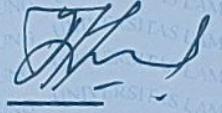
**2. Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian**



**Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A.**  
NIP. 19721006 199803 1 005

**MENGESAHKAN**

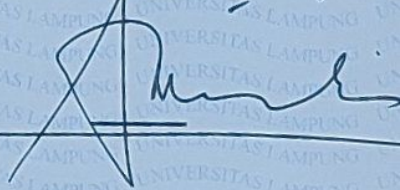
1. Tim Penguji  
Ketua : **Prof. Ir. Neti Yuliana, M.Si., Ph.D.**



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



Penguji  
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Sumardi, M.Si.**



Dekan Fakultas Pertanian



**Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M. P.**  
NIP. 196411181989021002

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 18 Januari 2024**

## PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nabila Rizka Putri Apri

NPM : 2014231003

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 bukan hasil dari plagiat karya orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila di kemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 13 Februari 2024  
Yang membuat pernyataan,



Nabila Rizka Putri Apri  
NPM. 2014231003

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Jaya, 28 September 2002, sebagai anak dari pasangan Bapak Apri Maryanto dan Ibu Dini Novianti. Penulis menyelesaikan Pendidikan sekolah dasar di SDN 1 Terbanggi Besar pada tahun 2014, kemudian melanjutkan pendidikan menengah pertama di SMPN 1 Terbanggi Besar dan selesai pada tahun 2017, selanjutnya Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMAN 1 Terbanggi Besar dan lulus pada tahun 2020. Penulis diterima sebagai mahasiswa Program Studi Teknologi Industri Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2020 melalui jalur SNMPTN.

Pada bulan Januari-Februari 2023, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Karta, Kecamatan Kota Agung Timur, Kabupaten Tanggamus. Pada bulan Juni-Agustus 2023, penulis melaksanakan Praktik Umum (PU) di PT. Siger Jaya Abadi, Lampung, dengan judul “Mempelajari Manajemen Persediaan Bahan Baku dan Produksi Rajungan Kaleng di PT. Siger Jaya Abadi”.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti UKM-U *English Society* Unila, mengikuti berbagai lomba berbahasa inggris tingkat nasional untuk “*storytelling*” dan “*short story writing*”. Penulis merupakan *Person in Charge* (PIC) *storytelling* periode 2023. Penulis juga bergabung dalam kepanitiaan lomba Bahasa inggris seperti *Love-comp* (skala nasional), *Funtastic* dan *For Fun Debate* (skala regional). Penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Mikrobiologi Dasar (genap 2023), Mikrobiologi Terapan (ganjil 2024), dan Mikrobiologi Industri (ganjil 2024).



## SANWACANA

Puji syukur penulis haturkan kepada Allah SWT, yang telah memberikan rahmat, kesehatan, pengetahuan, karunia, kemudahan serta hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Skripsi dengan judul “Karakteristik Minuman Probiotik Pulpa Kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan Konsentrasi Gula dan Khamir *Saccharomyces boulardii* Berbeda”, merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Kuswanta Futas Hidayat, M. P., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
3. Ibu Prof. Ir. Neti Yuliana, M. Si., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Pertama dan Dosen Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan bantuan dan pengarahan, bimbingan, kritik, saran, nasihat dan motivasi selama pelaksanaan perkuliahan dan penyusunan skripsi. Terima kasih juga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis dalam proyek penelitian terkait minuman probiotik pulpa kakao
4. Ibu Ir. Fibra Nurainy, M. T.A., selaku Dosen Pembimbing Kedua, yang telah banyak memberikan bantuan dan pengarahan, bimbingan, kritik, saran, nasihat, dan motivasi selama pelaksanaan penyusunan skripsi ini.
5. Bapak Prof. Sumardi, M. Si., selaku Dosen Pembahas yang telah memberikan saran, kritik, dan evaluasi terhadap skripsi ini.

6. Segenap Bapak dan Ibu dosen yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan dan wawasan kepada penulis selama menjadi mahasiswa di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
7. Staff administrasi dan laboratorium yang telah memberikan banyak bantuan kepada penulis selama menjadi mahasiswa di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.
8. Bapak Apri Maryanto dan Ibu Dini Novianti selaku orang tua dari penulis yang selalu memberikan dukungan moral, spiritual, material, motivasi, kasih sayang dan doa yang selalu menyertai penulis.
9. Sahabat-sahabat terbaik Fati Auzaky Ridwan, Arnetta Listiani, Sagita Putri Faradila, Dwi Apriyani, dan Yeri Agil Safitri yang telah menemani, membantu, mengibur, mendengar dan mendukung penulis.
10. Adira Salsabila Kirani, Aria Bima Sena, Hanny Rahma Cahyani, Fahma Addinni, dan Maya Sofa yang selalu mendengarkan keluhan kesah penulis, membantu, mendukung dan menemani penulis.
11. Teman-teman sejawat angkatan 2020 Prodi Teknologi Industri Pertanian atas segala informasi, doa, dukungan, serta kebersamaannya selama perkuliahan.
12. Semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis berharap semoga Allah membalas seluruh kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca

Bandar Lampung, 13 Februari 2024

**Nabila Rizka Putri Apri**

## DAFTAR ISI

|   | Halaman     |
|---|-------------|
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....   | <b>xii</b>  |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....  | <b>xiii</b> |
| <b>I. PENDAHULUAN</b> .....   | <b>1</b>    |
| 1.1 Latar Belakang.....   | 1           |
| 1.2 Tujuan Penelitian.....  | 3           |
| 1.3 Kerangka Pemikiran .....  | 3           |
| 1.4 Hipotesis .....   | 6           |
| <b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....                                     | <b>7</b>    |
| 2.1 Kakao dan Pulpa Kakao .....                                       | 7           |
| 2.2 Probiotik dan Minuman Probiotik.....                              | 9           |
| 2.3 Fermentasi .....  | 11          |
| 2.4 <i>Saccharomyces boulardii</i> .....                              | 13          |
| <b>III. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....                               | <b>15</b>   |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....                                  | 15          |
| 3.2 Bahan dan Alat Penelitian .....                                   | 15          |
| 3.3 Metode Penelitian .....   | 16          |
| 3.4 Prosedur Penelitian.....  | 17          |
| 3.4.1 Persiapan Starter .....   | 17          |
| 3.4.1.1 Inokulasi Starter Khamir <i>Saccharomyces boulardii</i> ..... | 17          |
| 3.4.1.2 Pembuatan Kultur Kerja Khamir <i>S.boulardii</i> .....        | 18          |
| 3.4.2 Pengolahan Pulpa Kakao .....                                    | 19          |
| 3.4.3 Pembuatan Minuman Pulpa Kakao .....                             | 20          |
| 3.5 Pengamatan.....   | 21          |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.5.1 Perhitungan Total Mikroba.....                              | 21        |
| 3.5.2 Total Soluble Solid .....                                   | 22        |
| 3.5.3 pH .....  | 22        |
| 3.5.4 Total Asam Titrasi .....                                    | 23        |
| 3.5.5 Total Gula .....  | 23        |
| 3.5.6 Pengujian Aktifitas Antimikroba dan perhitungan zona hambat | 24        |
| 3.5.7 Sensori .....   | 25        |
| <b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>                              | <b>29</b> |
| 4.1 Konfirmasi Data .....   | 29        |
| 4.2 Karakteristik Minuman Probiotik Pulpa Kakao .....             | 36        |
| 4.2.1 Karakteristik Mikrobiologi .....                            | 36        |
| 4.2.2 Karakteristik Fisiko-Kimia .....                            | 38        |
| 4.2.3 Karakteristik Sensori .....                                 | 40        |
| 4.3 Penentuan Formula Terbaik.....                                | 42        |
| <b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>                              | <b>45</b> |
| 5.1. Kesimpulan.....  | 45        |
| 5.2. Saran .....  | 45        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>                                       | <b>46</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>  | <b>56</b> |

## DAFTAR TABEL

| Tabel   | Halaman |
|---|---------|
| 1. Formula fermentasi pulpa kakao.....                            | 16      |
| 2A. Perbandingan data prediksi dan data konfirmasi.....           | 30      |
| 2B. Perbandingan data prediksi dan data konfirmasi.....           | 30      |
| 3. Hasil konfirmasi desain expert 12 formula A .....              | 31      |
| 4. Hasil konfirmasi desain expert 12 formula B .....              | 31      |
| 5. Hasil konfirmasi desain expert 12 formula C .....              | 31      |
| 6 Hasil konfirmasi desain expert 12 formula D .....               | 32      |
| 7. Karakteristik mikrobiologi .....                               | 36      |
| 8. Karakteristik fisiko-kimia .....                               | 38      |
| 9. Karakteristik sensori.....                                     | 40      |
| 10. Nilai <i>eigen</i> parameter pengujian .....                  | 43      |
| 11. Hasil perhitungan formulasi .....                             | 43      |
| 12. Data formulasi A .....  | 44      |
| 13. Data formulasi B .....  | 44      |
| 14. Penggabungan pendapat pakar .....                             | 57      |
| 15. Hasil perhitungan iterasi I .....                             | 58      |
| 16. Hasil perhitungan iterasi II.....                             | 59      |
| 17. Hasil perbandingan nilai eigen iterasi I dan iterasi II ..... | 59      |
| 18. Hasil perhitungan iterasi III .....                           | 60      |
| 19. Perbandingan nilai eigen iterasi II dan iterasi III .....     | 61      |
| 20. Nilai eigen setiap pengamatan .....                           | 61      |
| 21. Perhitungan formulasi karakteristik mikrobiologi .....        | 62      |
| 22. Perhitungan formulasi karakteristik fisiko-kimia .....        | 62      |
| 23. Perhitungan formulasi karakteristik sensori .....             | 63      |
| 24. Hasil penjumlahan bobot setiap formulasi.....                 | 63      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Kerangka Pemikiran fermentasi pulpa kakao dengan <i>S. boulardii</i> ..... | 3       |
| 2. Buah kakao.....  | 7       |
| 3. Diagram alir pembuatan kultur stok <i>S. boulardii</i> .....               | 8       |
| 4. Diagram alir pembuatan kultur kerja <i>S. boulardii</i> . .....            | 9       |
| 5. Diagram alir pengolahan pulpa kakao .....                                  | 20      |
| 6. Diagram alir pembuatan minuman probiotik pulpa kakao.....                  | 21      |
| 7. Kultur stok <i>S. boulardii</i> .....                                      | 64      |
| 8. Penginokulasian khamir ke dalam PDB.....                                   | 64      |
| 9. PDB setelah 20 jam.....  | 64      |
| 10. Penyaringan pulpa kakao .....   | 64      |
| 11. Pasturisasi ( <i>waterbath</i> ) pulpa kakao .....                        | 64      |
| 12. Penginokulasian cairan pulpa kakao .....                                  | 64      |
| 13. Penggoyangan menggunakan orbital shaker .....                             | 64      |
| 14. Minuman probiotik pulpa kakao .....                                       | 64      |
| 15. Pengujian antimikroba .....   | 65      |
| 16. Perhitungan total mikroba .....   | 65      |
| 17. Pengujian total asam tertitrasi .....                                     | 65      |
| 18. Pengujian total gula.....   | 65      |
| 19. Pengujian sensori .....   | 65      |

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang memberikan efek positif dengan cara menyeimbangkan mikroflora dalam usus manusia. Probiotik juga dapat membantu seleksi mikroba yang tidak berfungsi atau berefek negatif pada tubuh (Pangaribuan dkk., 2022). Minuman probiotik dapat membantu permasalahan gastrointestinal, pemulihan beberapa jenis penyakit, mencegah terjadinya diare, kanker usus besar, dan menghambat keberadaan bakteri patogen yang dapat membahayakan sistem pencernaan (Pais *et al.*, 2020, Halim dan Zubaidah, 2013). Sari buah juga dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan minuman probiotik, antara lain sari buah nanas dapat dibuat dengan menggunakan isolat *Lactobacillus rhamnosus* (Pangaribuan dkk., 2022), sari buah belimbing dengan kultur starter *Lactobacillus plantarum* (Islahah dan Wikandari., 2022).

Pulpa biji kakao adalah selaput berlendir berwarna putih yang membungkus biji kakao, dan terdapat sekitar 25%-30% dari berat biji. Komposisi kimia dari pulpa kakao yaitu air 86,38 %, karbohidrat 19,50%, lemak 1,45%, total protein 0,62%, dan abu (mineral) 0,36% (Yuliana dkk., 2023). Selain itu, pulpa kakao memiliki kandungan kalsium, zat besi, dan fosfor yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan minuman dari sari buah nanas (Afolabi *et al.*, 2015). Kandungan lain yang dimiliki oleh pulpa kakao adalah asam amino, protein, beberapa vitamin dan mineral. Kandungan-kandungan ini menjadikan pulpa kakao sebagai media yang potensial untuk pertumbuhan mikroba (Puerari *et al.*, 2012). Pemanfaatan pulpa kakao sebagai minuman probiotik dapat menjadi salah satu cara untuk meningkatkan nilai guna dan jual dari pulpa kakao.

Mikroorganisme yang dapat digunakan dalam pembuatan probiotik adalah khamir *Saccharomyces boulardii* yang bersifat non-patogen dan memiliki banyak manfaat, terutama untuk mencegah penyakit saluran pencernaan seperti diare. Khamir ini juga tidak menimbulkan efek samping (Pratiwi dan Sarbini., 2022). Pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain lama fermentasi, kandungan gula, dan konsentrasi inokulum (Khafifah, 2023, dan Marentina, 2023) Waktu fermentasi berkaitan dengan fase pertumbuhan khamir yang akan mempengaruhi jumlah khamir pada minuman probiotik. Semakin lama fermentasi maka mikroba akan semakin banyak dan akan tumbuh sampai tahap jenuh (Marentina, 2023., Rohman, 2019) . Waktu fermentasi yang tepat pada *Saccharomyces boulardii* akan memberikan kesempatan kepada khamir untuk memfermentasi sukrosa sebagai energi pertumbuhan (Yunus dan Zubaidah, 2015). Menurut Khafifah (2023) sukrosa yang ditambahkan pada minuman probiotik akan digunakan oleh *Saccharomyces boulardii* untuk melakukan metabolisme sehingga terjadi pertumbuhan, penambahan jumlah sel, dan menghasilkan asam-asam organik. Penelitian Tefa dkk. (2023) menunjukkan bahwa konsentrasi inokulum berpengaruh terhadap jumlah metabolit yang dihasilkan. Semakin tinggi konsentrasi inokulum dan konsentrasi gula maka kadar alkohol sebagai metabolit yang dihasilkan semakin tinggi. Konsentrasi inokulum juga berpengaruh terhadap jumlah sel khamir *Saccharomyces boulardii* (Khafifah, 2023., Marentina, 2023).

Beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan *Saccharomyces boulardii* sebagai *starter* adalah minuman teh hijau yang difermentasi (Wang *et al.*, 2022), minuman kopi fermentasi (Chan *et al.*, 2023), bir probiotik bebas alkohol (Senkarcinova *et al.*, 2019). Penelitian mengenai minuman probiotik pulpa kakao masih terbatas dan belum banyak dilakukan. Penelitian Khafifah (2023) dan Marentina (2023) mengenai minuman probiotik pulpa kakao yang difermentasi oleh *Saccharomyces boulardii* menghasilkan prediksi formulasi terbaik yang masih perlu divalidasi. Informasi terkait sifat fisiko-kimia, sensori dan antimikroba dari minuman probiotik pulpa kakao dengan konsentrasi gula dan inokulum *Saccharomyces boulardii* yang berbeda belum diketahui. Selain itu hasil kedua penelitian diatas belum diketahui perlakuan terbaik.

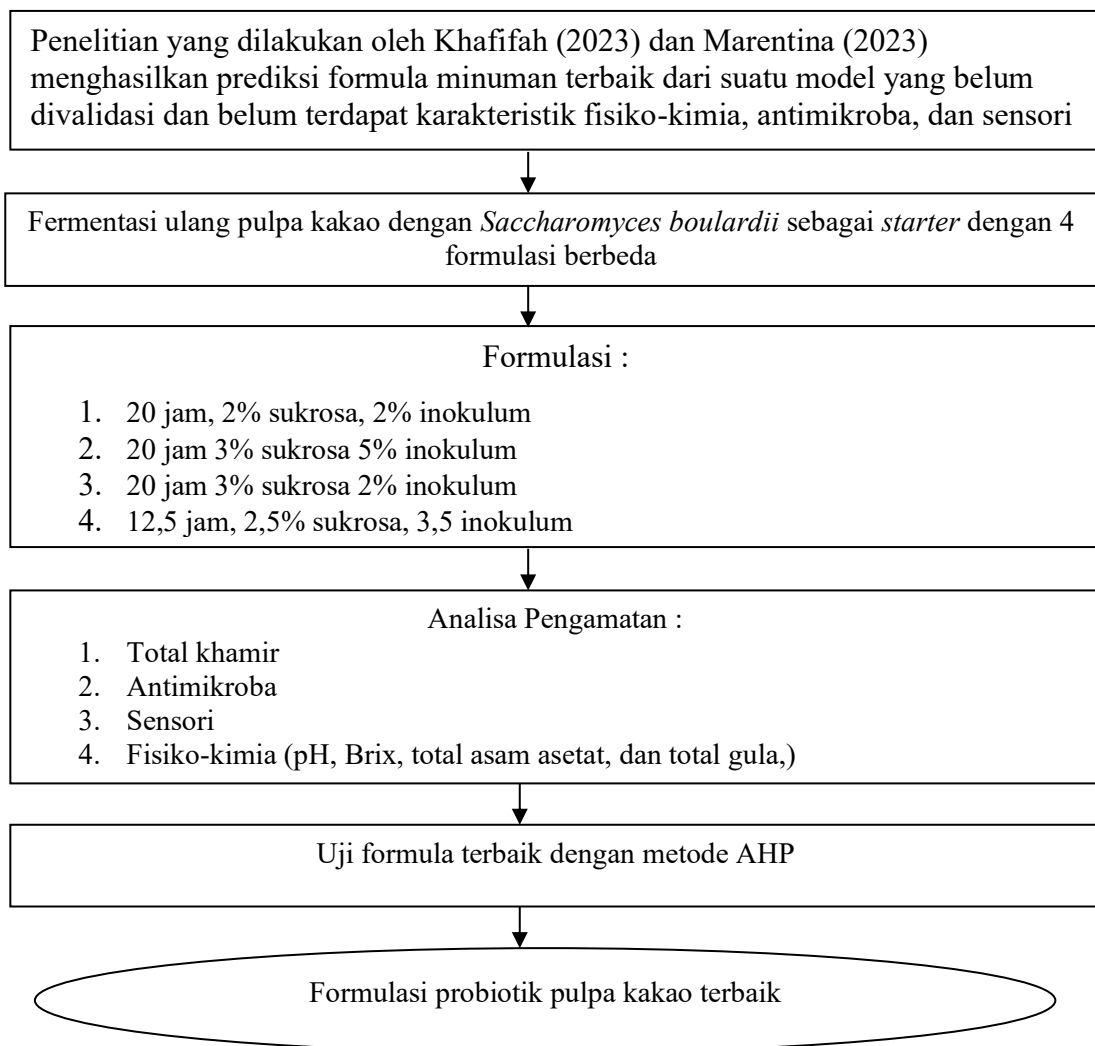


## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Melakukan validasi terhadap hasil prediksi terbaik penelitian sebelumnya
2. Mengetahui sifat fisiko-kimia, sensori, dan antimikroba dari minuman probiotik pulpa kakao menggunakan *Saccharomyces boulardii* dan menentukan formulasi terbaik.

## 1.3 Kerangka Pemikiran



Gambar 1. Kerangka Pemikiran fermentasi pulpa kakao dengan *S. boulardii* pada karakteristik minuman probiotik

Khafifah (2023) dan Marentina (2023) melakukan penelitian dengan menggunakan cairan pulpa kakao dan *Saccharomyces boulardii* untuk menghasilkan minuman probiotik pulpa kakao. Formulasi fermentasi yang digunakan pada kedua peneliti tersebut berasal dari prediksi formula dengan menggabungkan tiga variabel yaitu lama fermentasi, konsentrasi inokulum, dan konsentrasi sukrosa. Penelitian tersebut menghasilkan prediksi formula minuman terbaik dari suatu model yang belum divalidasi dan belum terdapat karakteristik fisiko-kimia, antimikroba, dan sensori.

Formulasi terbaik respon prediksi RSM total khamir, total gula, dan total asam yaitu : (1) lama fermentasi 20 jam, konsentrasi sukrosa 3% dan konsentrasi inokulum 5%. Menurut hasil respon sensori terdapat dua sampel minuman probiotik yang memiliki nilai presentase terbaik yaitu : (2) lama fermentasi 12,5 jam ; konsentrasi sukrosa 2,5% dan inokulum 3,5%. (3) lama fermentasi 20 jam ; konsentrasi sukrosa 3% dan inokulum 2%. Berdasarkan penelitian Marentina (2023), solusi optimasi RSM antimikroba terbaik yaitu : (4) lama fermentasi 20 jam, konsentrasi sukrosa 2% dan konsentrasi inokulum 2%. Penelitian ulang perlu dilakukan pada cairan pulpa kakao dengan *Saccharomyces boulardii* dengan formulasi dari hasil prediksi terbaik dari penelitian Khafifah (2023) dan Marentina (2023).

Berdasarkan penelitian Marentina (2023), lama fermentasi 20 jam, gula 2%; dan inokulum 2% menghasilkan zona bening (antibakteri) tertinggi yaitu sekitar 4mm. Penelitian Hidayatulloh (2019), menunjukkan *L. plantarum* menghasilkan senyawa metabolit yang berfungsi sebagai antibakteri dan dihasilkan secara optimal pada fase logaritmik dari masa inkubasi. *Saccharomyces boulardii* memiliki kemampuan untuk menghambat endotoksin permukaan *Escherichia coli* melalui proses defosforilasi (Pais *et al.*, 2020). Beberapa strain *S. boulardii* mampu menghasilkan asam asetat dengan konsentrasi tinggi yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* (Offei *et al.*, 2019).

Berdasarkan data penelitian Khafifah (2023), fermentasi pada 20 jam, sukrosa 3% dan inokulum 5% menghasilkan total khamir paling banyak dan memenuhi

syarat kriteria minuman probiotik. Proses fermentasi memerlukan waktu yang cukup untuk menghasilkan total khamir yang sesuai dengan standar SNI mengenai minuman susu fermentasi berperisa. Minuman probiotik memerlukan fermentasi mencapai masa logaritmik, karena pada masa ini mikroorganisme sedang memperbanyak diri secara cepat dan konstan menjadi dua kali dari proses sebelumnya (Sarjono dkk., 2021). Semakin tinggi konsentrasi sukrosa akan meningkatkan nilai total BAL karena pertumbuhan yang meningkat (Tampinongkol dkk., 2020., Devi dkk., 2022).

Penelitian Khafifah (2023), mengenai sensori pada minuman probiotik pulpa kakao terdapat dua sampel yang memiliki nilai presentase terbaik yaitu lama fermentasi 12,5 jam ; konsentrasi sukrosa 2,5% dan inokulum 3,5% dan lama fermentasi 20 jam ; konsentrasi sukrosa 3% dan inokulum 2%. Pada kedua formulasi tersebut panelis berpendapat bahwa sampel terasa manis dan sedikit asam dengan aroma yang tidak menyengat. Lama fermentasi akan menyebabkan warna menjadi pucat dan memudar karena meningkatkan total khamir dan asam (Ningsih dkk., 2019). Pada kedua sampel tersebut panelis mampu menerima produk probiotik ini seperti minuman probiotik komersial (Khafifah, 2023).

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini adalah total khamir, antimikroba, fisiko-kimia (pH, brix, total gula, dan total asam) dan sensori. Validasi dilakukan dengan melakukan penelitian ulang mengikuti model formulasi terbaik penelitian Khafifah (2023) dan Marentina (2023). Penelitian diperlukan untuk memvalidasi bahwa formula minuman probiotik tersebut dapat dibuat untuk menghasilkan minuman probiotik pulpa kakao yang bersifat komersial, mampu memenuhi syarat dasar minuman probiotik, dan mampu diterima oleh konsumen. Data hasil penelitian diamati dan dibandingkan dengan hasil prediksi dari penelitian sebelumnya.

## 1.4 Hipotesis

Hipotesis dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Terdapat kesesuaian antara nilai validasi dan nilai prediksi
2. Terdapat pengaruh *Saccharomyces boulardii* terhadap sifat fisiko-kimia, sensori, dan antimikroba dari minuman probiotik pulpa kakao serta terdapat formula fermentasi terbaik.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kakao dan Pulpa Kakao

Kakao adalah buah yang dihasilkan dari tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) dan memiliki nilai jual yang cukup tinggi sehingga mampu diusahakan secara komersial. Nilai ekonomis utama yang ada pada tanaman ini berasal dari buah dan bijinya. Tanaman kakao berasal dari genus *Theobroma* dari Familia *Sterculiaceae*. Menurut Tjitrosoepomo (1988), sistematika tanaman kakao sebagai berikut.

Divisi : *Spermatophyta*  
Anak Divisi : *Angiospermae*  
Kelas : *Dicotyledoneae*  
Anak Kelas : *Dialypetalae*  
Bangsa : *Malvales*  
Suku : *Sterculiaceae*  
Marga : *Theobroma*  
Jenis : *Theobroma cacao* L



Gambar 2. Buah kakao  
Sumber : (dokumentasi pribadi)

Tanaman kakao akan berproduksi dalam jumlah sedikit pada tahun pertama dan akan meningkat seiring dengan penambahan umur tanaman. Produksi optimal tanaman kakao terjadi pada umur 7-11 tahun. Warna buah kakao pada saat muda yang berwarna merah dan jika sudah masak akan berubah menjadi orange atau jingga merupakan buah kakao jenis Criollo (Susanto, 1994). Buah kakao terdiri dari 4 bagian yaitu 73,7% kulit buah, 10,1% daging buah (*pulp*), 2,0% plasenta, dan 14,2% biji (Chandrasekaran, 2012). Jumlah biji dalam satu buah kakao berkisar antara 20-50 biji (Darojat, 2014). Biji buah kakao tersebut diselimuti oleh pulpa kakao, daging buah yang berwarna putih, memiliki tekstur yang lunak, berarir, dan rasanya perpaduan dari manis dan asam (Wardani, 2019). Pulpa merupakan lapisan endosperm yang tebal dan terdiri dari sel-sel turbuler dengan ruang antar sel yang besar (Murugan dan Al-Sohaibani, 2012). Keberadaan pulpa melekat pada biji kakao yang jika buah pada keadaan mentah pulpa akan membengkak dan jika buah dalam keadaan matang maka akan menjadi lunak dan berlendir.

Salah satu kegiatan yang dilakukan untuk menghilangkan pulp yang membungkus biji kakao adalah fermentasi biji kakao. Proses fermentasi akan menghasilkan hasil samping yaitu kulit buah kakao dan cairan pulpa kakao. Proses fermentasi 1 ton biji kakao dapat menghasilkan cairan pulpa kakao sebanyak 75-100 liter (Safitri, 2019). Selama proses fermentasi dihasilkan sekitar 15-20% cairan pulpa kakao (Ganda-putra dkk., 2008). Pulpa biji kakao mengandung gula dan polisakarida yang dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk melakukan proses fermentasi (Rachmatullah dkk., 2021).

Pulpa kakao hasil samping dari fermentasi biji kakao belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sehingga sering dianggap sebagai limbah dan hanya dibuang saja tanpa adanya pengolahan lebih lanjut. Pembuangan pulpa kakao dilakukan oleh masyarakat karena kurangnya pengetahuan mengenai cara untuk mengolah dan meningkatkan nilai guna dan jual pulpa kakao. Pengaplikasian pulpa kakao pada bidang non pangan dapat dilihat melalui penelitian yang dilakukan oleh Purwati dan Nurhantika (2016), untuk menggunakan limbah pulpa kakao sebagai bahan baku dasar dalam pembuatan bioethanol dan sebagai bahan dasar pembuatan asam

asetat (Mahadewi dkk., 2014). Sedangkan penerapan pengolahan pada pulpa kakao dalam bidang pangan terlihat antara lain : *nata de cacao* dengan bantuan bakteri *Acetobacter xylinum* (Nurfaillah dkk., 2018), pembuatan kombucha pulpa kakao (Wibowo., 2023), permen jelly pulpa kakao (Dos Santos *et al.*, 2014), minuman ringan, minuman probiotik dan cuka fermentasi (vinegar) (Yuliana dkk., 2022).

## 2.2 Probiotik dan Minuman Probiotik

Menurut FAO (2001), probiotik adalah mikroba hidup yang mampu memberi manfaat bagi inangnya dengan jumlah yang cukup yaitu sekitar  $10^6$ - $10^8$  CFU/g. Pada sistem pencernaan jumlah ini diharapkan dapat bertambah dan berkembang sehingga dapat menjadi  $10^{12}$  CFU/g (Widyantara dkk., 2020). Menurut Aqil *et al* (2016), probiotik adalah mikroorganisme yang mampu membantu proses sistem pencernaan sehingga mampu memperlancar metabolisme tubuh. Menurut Sahara *et al.* (2018) keberadaan mikroflora pada sistem pencernaan memiliki peranan yang penting karena dapat menghasilkan enzim yang dapat membantu berjalannya proses pencernaan. Tidak semua bakteri dapat digunakan sebagai bakteri probiotik, sehingga terdapat beberapa syarat utama bakteri agar dapat dijadikan sebagai bakteri probiotik, yaitu mampu bertahan pada keadaan pH rendah, dapat tumbuh dan berkembang pada garam empedu, dapat hidup secara berkoloni, dan memiliki aktivitas antimikroba (Sunaryanto dkk., 2014). Salah satu probiotik yang umum digunakan adalah bakteri asam laktat (BAL), misalnya *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*

Mekanisme kerja dari probiotik adalah dengan mengurai karbohidrat rantai panjang, protein, dan lemak dengan menggunakan enzim khusus (Widyarningsih, 2011). Sel probiotik memiliki permukaan dinding sel yang terdiri dari makromolekul yang menjadi faktor penentu sel probiotik mampu berinteraksi dengan sistem pencernaan inang. Makromolekul tersebut adalah *key probiotic ligands* yang mampu melakukan interaksi dengan reseptor inang sehingga mampu menginduksi jalur *signaling* yang dapat menghasilkan manfaat dan efek positif

dari probiotik. Bakteri probiotik mampu mengubah respon imun dari inang dengan cara berinteraksi dengan sel imun dan sel epitel insitne (Leeber *et al.*, 2010). Manfaat utama dari penggunaan probiotik pada minuman adalah merangsang respon imun bawaan dan memulihkan komposisi dan aktivitas mikrobiota usus (Mazziotta *et al.*, 2023).

Probiotik akan bekerja dengan cara berkompetisi dengan patogen untuk mendapatkan nutrisi, kemudian probiotik akan memproduksi antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Probiotik juga akan memproduksi lendir untuk meningkatkan sambungan protein untuk mencegah perpindahan lokasi bakteri patogen dari usus ke dalam darah. Probiotik mengatur imunitas inang dengan memodulasi pematangan dan fungsi sel dendritik yang kemudian meningkatkan aktivitas sel T yang berperan penting dalam homeostasis imun. Probiotik juga mengatur produksi *neurotransmitter* termasuk serotonin, dopamin dan asam *gamma aminobutyric* (GABA) (Plaza-Diaz *et al.*, 2019).

Perkembangan minuman probiotik *non-dairy* sedang banyak dilakukan karena menurut Grumezescu dan Holban (2018) sebanyak 70% penduduk di Asia mengalami laktosa intoleran. Pembuatan minuman probiotik berbasis nabati menjadi salah satu alternatif karena diyakini tidak memiliki kandungan alergen yang berbahaya bagi inangnya (Bujna *et al.*, 2017). Bahan nabati yang dapat digunakan sebagai bahan minuman probiotik adalah sari buah atau sayuran atau kombinasi dari keduanya (Xu *et al.*, 2019), contohnya hasil penelitian dari Rizal dkk (2016) mengenai minuman fermentasi laktat dari buah nanas dengan variasi jenis bakteri asam laktat (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*). Minuman probiotik termasuk kedalam contoh produk pangan fungsional karena mampu menyehatkan inangnya melalui penyeimbangan mikroflora dalam saluran pencernaan (Nurainy dkk., 2018).



### 2.3 Fermentasi

Fermentasi adalah suatu proses perubahan kimia pada pada suatu substrat organik yang disebabkan oleh aktivitas anzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Suprihatin, 2010). Fermentasi menjadi salah satu metode pengolahan pangan yang umum dilakukan dan salah satu metode yang bersifat ekonomis yang dapat digunakan untuk memperpanjang umur simpan dan meningkatkan kualitas sehingga mampu meningkatkan nilai jual produk (Mulyani dkk., 2022). Fermentasi dapat dilakukan dengan bantuan kapang, khamir, bakteri, atau campuran dari berbagai mikroorganisme (Suryani dkk., 2017).

Pertumbuhan mikroorganisme dapat mempengaruhi percepatan fermentasi, nutrient tambahan, karbohidrat, mineral, dan nitrogen juga dibutuhkan agar mikroorganisme dapat tumbuh dan bekerja secara optimal (Akbar dkk., 2015). Lama fermentasi dipengaruhi oleh faktor-faktor langsung maupun tidak langsung seperti substrat, suhu, pH, oksigen, dan mikroba yang digunakan (Nasrun dkk., 2015). Waktu fermentasi juga menjadi salah satu variabel yang berkaitan dengan fase pertumbuhan mikroba selama proses fermentasi. Hal ini membuat waktu fermentasi menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi hasil fermentasi (Khafifah, 2023).

Inokulum juga menjadi salah satu faktor penting dalam proses keberhasilan fermentasi. Inokulum adalah populasi mikroorganisme atau sel yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi (Sood *et al.*, 2011). Semakin banyak inokulum yang ditambahkan maka semakin besar asam laktat yang dihasilkan dan kadar asam pun semakin tinggi yang berakibat rasa yang dihasilkan menjadi sangat asam, sedangkan jika jumlah inokulum yang diberikan sedikit maka proses fermentasi tidak terjadi penggumpalan dan menghasilkan rasa dan aroma kurang lezat (Febriana dan Prima, 2020). Terdapat beberapa faktor yang mampu mempengaruhi kualitas minuman probiotik hasil fermentasi seperti jumlah starter yang digunakan, jenis substrat, suhu, oksigen, serta durasi dari proses fermentasi (Kurniadi dan Suharyono, 2010).

Selama proses fermentasi berlangsung, bakteri yang tersedia pada substrat akan dirombak oleh mikroorganisme untuk melakukan proses metabolisme sehingga mampu melakukan proses fermentasi yang menghasilkan karbon, hal ini membuat jumlah gula semakin menurun seiring dengan lamanya fermentasi yang terjadi (Kusuma dkk., 2020). Peningkatan aktivitas mikroorganisme sebagai kegiatan dari fermentasi juga menyebabkan penurunan pH pada substrat (Kurniadi dan Suharyono, 2010).

Kondisi penurunan pH ini karena proses metabolisme yang dilakukan mikroorganisme menghasilkan asam laktat dan asam lemak rantai pendek atau umum disebut sebagai *Short Chain Fatty Acid* (SCFA) seperti asam butirat, *propionate*, dan asam asetat (Suryono dan Wikandari, 2019). Senyawa SCFA ini memiliki beberapa khasiat seperti mencegah kanker kolon dan menurunkan pH kolon yang membantu pertumbuhan mikroflora yang ada didalam usus, serta menurunkan aktivitas enzim bakteri yang bersifat karsinogenik dan toksik pada usus (Azhar, 2009).

Waktu fermentasi juga sangat penting untuk diperhatikan karena mampu mempengaruhi jumlah sel dan hasil akhir sensori. Waktu fermentasi yang ditentukan harus berada pada waktu optimal, karena jika waktu fermentasi yang terlalu sebentar maka mikroorganisme baru mencapai masa lag yaitu fase bertambahnya ukuran sel mikroorganisme (Hidayatulloh dkk., 2019). Sedangkan minuman probiotik memerlukan fermentasi mencapai masa lag, karena pada masa ini mikroorganisme sedang memperbanyak diri secara cepat dan konstan menjadi dua kali dari proses sebelumnya (Sarjono dkk., 2021). Pada fase lag ini kemungkinan jumlah sel untuk mencapai syarat minuman probiotik didapatkan. Waktu fermentasi juga mempengaruhi hasil sensori dari produk. Jika proses fermentasi terlalu lama maka rasa produk akan sangat asam sedangkan jika proses fermentasi terlalu sebentar maka rasa produk tidak asam karena aktivitas fermentasi belum terjadi dengan maksimal.

Nilai pH dari produk fermentasi semakin lama memiliki nilai pH yang semakin rendah. Hal ini dapat terjadi karena mikroorganisme seperti khamir menghasilkan asam-asam organik misalnya asam asetat, asam glukonat dan asam glukoronat sebagai hasil dari metabolisme (fermentasi) yang dilakukan (Budiandari dkk., 2023).

#### **2.4 *Saccharomyces boulardii***

*Saccharomyces boulardii* adalah khamir yang didapatkan dari isolasi buah-buahan yang terdapat di Indocina (Edwards *et al.*, 2007). *Saccharomyces boulardii* ditemukan oleh seorang ahli mikrobiologi Perancis, Henri Boulard pada tahun 1920 saat dia berada di Indocina. Henri Boulard berkunjung saat terjadi wabah kolera dan menemukan fakta bahwa terdapat beberapa orang yang tidak menderita kolera karena meminum teh khusus. Teh ini dibuat dengan mengambil kulit buah leci dan manggis untuk kemudian dimasak untuk dijadikan teh. Kemudian Hendri Boulard mencoba mengisolasi agen mikroorganisme yang berada pada kulit buah tersebut dan berhasil, khamir ini dikelompokkan sebagai khamir khusus dan diberi nama *Saccharomyces boulardii* (Mcfarland, 2017).

*Saccharomyces boulardii* berkerabat dekat dengan khamir roti *Saccharomyces cerevisiae*, namun terdapat beberapa ciri pertumbuhan yang berbeda sehingga *S. boulardii* didefinisikan berbeda dengan *S. cerevisiae*. Beberapa ciri pertumbuhan yang berbeda yaitu suhu pertumbuhan pada tubuh manusia, kemampuan bertahan hidup pada keasaman yang berbeda, defisiensi dalam menggunakan galaktosa, dan ketidak mampuan untuk membentuk ascospore (Lukaszewicz, 2012). *Saccharomyces boulardii* tumbuh dengan optimal pada kisaran suhu 37°C dan pH 5,5 (Dias, 2022). Khamir probiotik seperti *S. boulardii* berbeda dengan bakteri probiotik dari segi struktur fisiologis, ukurannya (cenderung lebih besar), tidak mudah memperoleh gen resisten antibiotik dan tidak mudah terpengaruh oleh antibiotik (Mcfarland, 2017).

*Saccharomyces boulardii* telah berkembang menjadi obat diare pada tahun 1950 dan kemudian berkembang menjadi salah satu produk pengobatan yang tersedia

secara komersial di Eropa, Amerika Selatan, dan Afrika Selatan (Edward *et al.*, 2007). Sifat dari *Saccharomyces boulardii* adalah non-patogen dan memiliki banyak manfaat bagi inangnya. *Saccharomyces boulardii* adalah khamir yang termasuk kedalam golongan probiotik karena mampu memberikan manfaat kesehatan bagi usus dan sistem pencernaan inangnya. Khamir ini terbukti mampu mengobati masalah pada pencernaan seperti diare (Pais *et al.*, 2020). Beberapa ciri dari *S. boulardii* yang memperkuat alasan ditetapkannya sebagai khamir probiotik adalah tingkat kemampuan bertahan hidup dalam kondisi lambung yang cukup tinggi, tidak dapat dihambat oleh antibiotik bakteri, dan selaras dengan mikroflora normal (Tomičić *et al.*, 2016).

*Saccharomyces boulardii* memiliki beberapa jenis mekanisme kerja yang dapat diklasifikasikan menjadi beberapa area utama yaitu : (1) efek antitoksin, (2) perlindungan fisiologis, (3) modulasi mikrobiota normal, (4) metabolisme regulasi, (5) efek trofik atau nutrisi, (6) regulasi sistem kekebalan, dan (7) penghambatan patogen secara langsung. Patogen yang mengeluarkan toksin di dalam lumen usus akan diganggu aktivitasnya oleh *S. boulardii*. Selain itu khamir ini juga akan mempertahankan fisiologi sel, mengganggu pelekatan patogen pada dinding lumen usus, berinteraksi dengan mikrobiota normal, dan membantu membangun kembali kadar asam lemak rantai pendek (SCFA). Fungsi lainnya dari *S. boulardii* adalah mampu bertindak sebagai pengatur imunitas dari inangnya baik didalam lumen usus, sistem pencernaan ataupun secara sistemik (Mcfarland, 2017). *Saccharomyces boulardii* mengkodekan tambahan protein adhesi yang berfungsi untuk mengikat dan menghentikan penempelan bakteri patogen pada mukus di usus (Khatri *et al.*, 2017).

### III. METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorim Mikrobiologi FMIPA, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, Laboratorium Analisis Hasil Pertanian dan Analisis Sensori di Teknologi Hasil Pertanian. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan Desember 2023

#### 3.2 Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan antara lain timbangan analitik, baskom, kompor, plastik, kain saring, wadah botol kaca, inkubator (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 (WSI), oven, *laminar air flow*, *centrifuge*, *autoclave*, alat titrasi, pH meter, 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 toko *online*. Bahan-bahan untuk analisa antara lain, sukrosa, media Potato Dextrse Agar (PDA) (Merck KGaA), *Potato Dextrose Broth* (PDA) (Merck KGaA), air destilat, *lactophenol cottonblue*, dan alkohol 96%. Bahan uji gula glukosa (Merck KGaA), larutan

fenol (Merck KGaA), dan asam sulfat (Merck KGaA). Bahan uji asam tertitrasi larutan NaOH 0,1 N (Merck KGaA). Bahan uji antimikroba yaitu, antibiotik (stepromycin), *blank disk*, mikroba uji (*E. coli* dan *B. subtilis*), Natrium Agar (NA) (Merck KGaA) dan Natrium Broth (NB) (Merck KGaA).

### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan percobaan dan pengujian, kemudian dianalisis melalui 3 tahapan yaitu memvalidasi 4 formula dari nilai prediksi model penelitian sebelumnya, melakukan karakterisasi, dan menentukan formula terbaik dengan metode AHP terhadap empat formula fermentasi pulpa kakao dan satu pulpa kakao yang tidak difermentasi sebagai kontrol. Terdapat. Empat formula ini didapatkan dari hasil terbaik penelitian oleh Marentina (2023) dan Khafifah (2023). Formula fermentasi pulpa kakao dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formula fermentasi pulpa kakao

| No | Waktu fermentasi | Sukrosa | Inokulasi | Kode Perlakuan |
|----|------------------|---------|-----------|----------------|
| 1  | 20 jam           | 2 %     | 2%        | A              |
| 2  | 20 jan           | 3%      | 5%        | B              |
| 3  | 20 jam           | 3%      | 2%        | C              |
| 4  | 12,5 jam         | 2,5 %   | 3,5%      | D              |

Seluruh formula dilakukan sebanyak dua kali pengulangan, sehingga total unit percobaan adalah  $5 \times 2 = 10$  unit percobaan. Setelah fermentasi dilakukan pengamatan mikrobiologi (total khamir dan antimikroba), fisiko-kimia (pH, Brix, total gula, dan total asam), dan sensori. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan selanjutnya dilakukan validasi data dengan menggunakan aplikasi *design expert* 12 dan penentuan perlakuan terbaik dengan pembobotan, menggunakan metode *Analytical Hierarchy Process* (AHP)

Metode AHP dilakukan dengan menentukan urutan kepentingan atribut pengujian yang dilakukan oleh pakar. Kemudian menyusun prioritas dengan melakukan perbandingan berpasangan yang disusun dalam bentuk matriks dengan memberikan skor kepentingan 1-9 berdasarkan skala perbandingan AHP milik Saaty (1993). Kemudian hasil penentuan prioritas berdasarkan pakar digabungkan

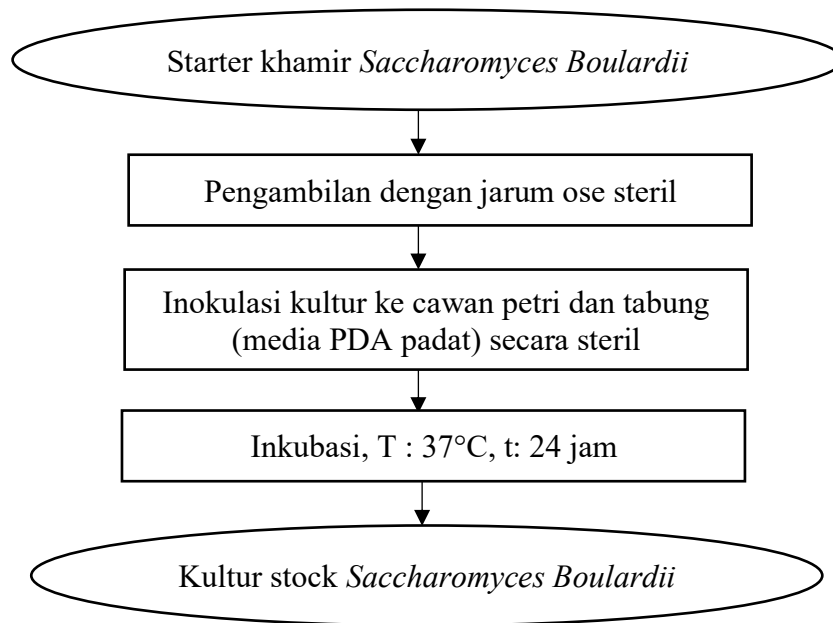
untuk menghasilkan satu pendapat untuk kemudian dihitung dan menghasilkan matriks berpasangan dan dihitung untuk mendapatkan nilai *eigen*. Hal yang harus diperhatikan dari perhitungan AHP adalah nilai *eigen* pada setiap atribut, jika dijumlahkan bernilai 1,000, maka dapat dikatakan nilai perhitungan konsisten. Kemudian pengujian konsistensi perhitungan AHP dilakukan dengan menghitung CI (*Consistency Ratio*) dan CR (*Consistency Ratio*) dengan syarat nilai dianggap konsisten jika nilai CI dan CR < 1. Urutan kepentingan atribut pada minuman probiotik pulpa kakao secara berurutan yaitu, antimikroba, total khamir, sensori, total asam, pH, total gula, dan TSS (*Total Soluble Solid*).

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Persiapan Starter**

##### **3.4.1.1 Inokulasi Starter Khamir *Saccharomyces boulardii***

Starter khamir *Saccharomyces boulardii* yang berbentuk serbuk pada kapsul dibuka dan diambil dengan jarum ose dalam keadaan steril sebanyak 1 ose secara aseptik. Kemudian *S. boulardii* diinokulasikan dengan menggunakan metode *streak* kuadran IV pada cawan petri dan tabung reaksi yang sudah berisikan media PDA padat. Setelah itu, starter khamir diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. *Saccharomyces boulardii* siap digunakan sebagai kultur stok.

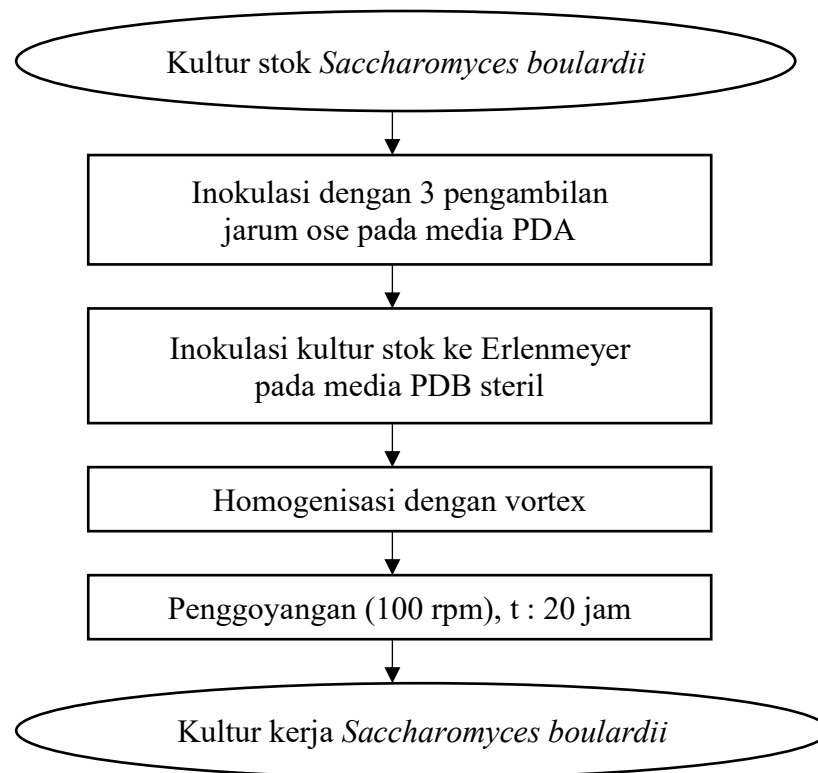


Gambar 3. Diagram alir pembuatan kultur stok *S. boulardii*

#### 3.4.1.2 Pembuatan Kultur Kerja Khamir *Saccharomyces boulardii*

Langkah pertama, kultur stok *S. boulardii* pada tabung reaksi (PDA) diinokulasikan sebanyak 3 kali dengan menggunakan jarum ose ke media PDB yang terdapat di Erlenmeyer dan dilakukan secara aseptis di dekat bunsen di dalam *laminar air flow*. Kemudian, PDB yang telah diinokulasikan diletakkan pada *orbital shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 20 jam.

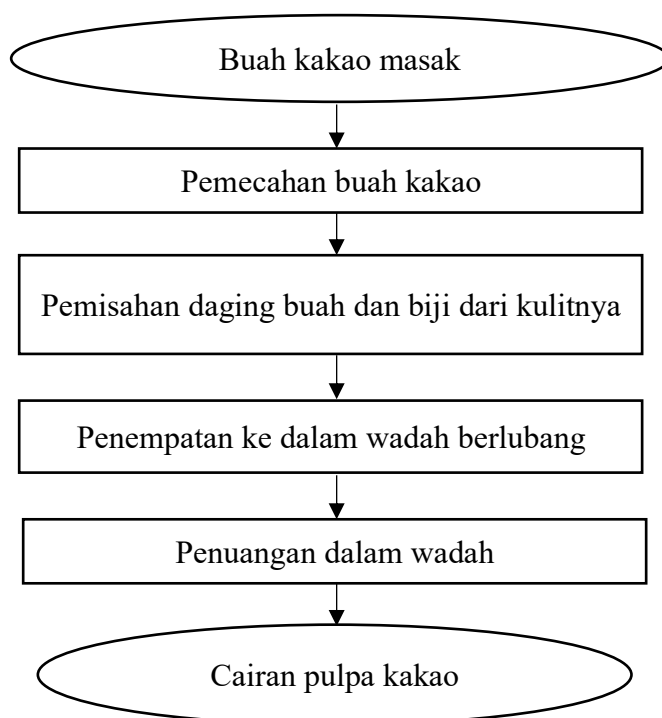




Gambar 4. Diagram alir pembuatan kultur kerja *S. boulardii* (Dias, 2022).

### 3.4.2 Pengolahan Pulpa Kakao

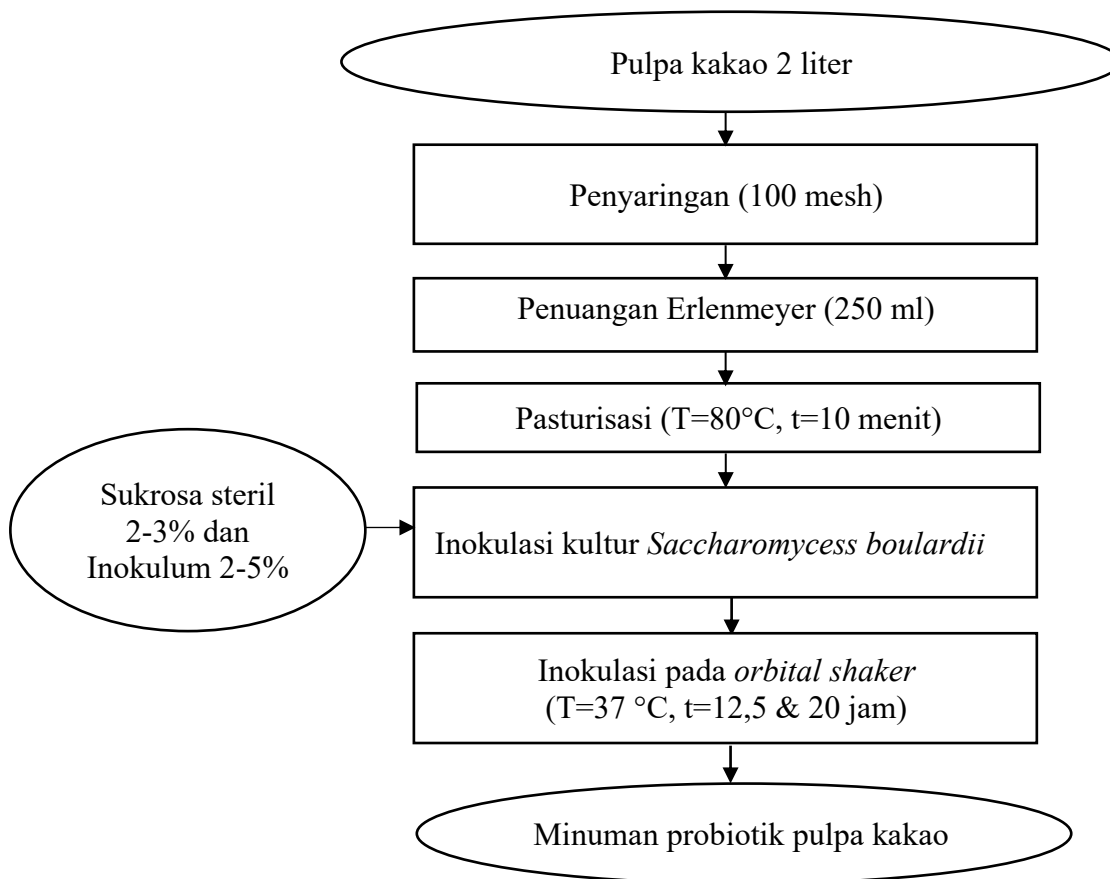
Buah kakao dari kebun petani dipilih yang sudah matang berwarna merah kekuningan, kemudian dipetik dan dikumpulkan. Buah yang telah dipanen dipecah dengan balok kayu. Kemudian daging buah kakao dipisahkan dari kulitnya. Daging buah yang terdiri dari biji, plasenta dan pulpa kakao diletakkan di dalam wadah yang bagian dasarnya berlubang. Cairan yang keluar ditampung dalam wadah besar kemudian dimasukkan ke dalam wadah dan didapatkan cairan pulpa kakao.



Gambar 5. Diagram alir pengolahan pulpa kakao (Yuliana dkk., 2022).

### 3.4.3 Pembuatan Minuman Pulpa Kakao

Pulpa kakao sebanyak 2 liter disaring dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 250 ml sebanyak 200 ml. Kemudian, Erlenmeyer yang berisi pulpa kakao dipasteurisasi dengan menggunakan waterbath pada suhu 80°C selama 10 menit, lalu didiamkan sampai suhu ruang. Kemudian sukrosa steril sebanyak 2-3% dan inokulum *Saccharomyces boulardii* sebanyak 2-5% dengan kerapatan sel log 7.9 cell (cfu/ml) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi pulpa kakao, lalu dihomogenkan perlahan. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasi pada suhu ruang dengan menggunakan *orbital shaker* sesuai dengan waktu lama fermentasi masing-masing perlakuan sampel yaitu 12,5 dan 20 jam. Minuman probiotik pulpa kakao yang telah difermentasi, siap dilakukan pengujian lebih lanjut.



Gambar 6. Diagram alir pembuatan minuman probiotik pulpa kakao (Khafifah, 2023)

### 3.5 Pengamatan

#### 3.5.1 Perhitungan Total Mikroba (Gabriel dan Riyatno, 1989).

Perhitungan total khamir menggunakan alat hemositometer. Sebelum digunakan, hemositometer dibersihkan dengan alkohol 70% dan tisu halus. Kemudian kaca hemositometer diletakkan diatas hemositometer. Sebanyak satu tetes sampel ditetaskan pada lekukan tepi kaca penutup hemositometer dengan pipet dan dibiarkan sampai sampel mengalir dan memenuhi ruang hitung, lalu ditambahkan pewarna *lactophenol cottonblue*. Hemositometer diletakkan di atas meja mikroskop dan diamati dengan perbesaran 40x serta dihitung jumlah khamir yang terdapat pada 80 kotak kecil yang terletak di dalam kotak tengah berukuran 1mm.

Kerapatan koloni dapat dihitung dengan menggunakan rumus menurut Gabriel dan Riyatno (1989).

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

Keterangan :

- C : Kerapatan koloni per mL larutan  
 t : Jumlah total koloni 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 hemositometer

### 3.5.2 Total Soluble Solid (TSS)

Kadar TSS ditentukan dengan menggunakan *hand refractometer*. Alat ini dapat digunakan dengan lebih mudah serta hasil pengukurannya yang cepat dan akurat. *Hand refractometer* akan membaca konsentrasi gula pada larutan dengan bantuan indeks bias atau refraksi cahaya. Sebelum digunakan, *refractometer* dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan aquades dan dilap kain *microfiber*. Pertama, sampel minuman probiotik pulpa kakao diambil dengan menggunakan pipet tetes. Lalu satu tetes sampel diteteskan pada prisma biru lalu ditutup dengan *day light plate* (cover). Lalu brix sampel dapat dilihat dengan meletakkan alat pada mata dan diarahkan ke cahaya matahari.

### 3.5.3 pH

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

### 3.5.4 Total Asam Titrasi (Yuliana *et al.*, 2023)

Pengujian total asam asetat dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi terlebih dahulu dengan larutan buffer pH 7.01 dan pH 4.01. Sebanyak 20 ml sampel dimasukkan ke dalam gelas beaker, lalu dimasukkan pH meter. Sampel dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sambil diukur pHnya. Jika pH pada pH meter sudah menunjukkan 8,3 maka proses titrasi dapat dihentikan. Lalu jumlah NaOH yang digunakan dicatat. Perhitungan total asam asetat dapat dilakukan dengan rumus :

$$\text{Total asam titrasi \%} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{Eq wt} \times 100}{\text{volume sampel} \times 1000}$$

Keterangan :

- ml NaOH : Jumlah NaOH yang keluar dari buret
- N NaOH : Normalitas larutan NaOH
- Eq wt : *Equivalent weight of acetic acid* (60.05 mg/mEq)
- Volume sampel : Jumlah sampel yang dititrasi

### 3.5.5 Total Gula (Dubois *et al.*, 1956)

Pengujian total gula yang dilakukan ini dengan metode fenol-sulfat. Langkah pertama, 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 aquades sampai 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 divortex. Larutan asam sulfat pekat sebanyak 2,5 ml ditambahkan dengan cepat secara tegak lurus ke permukaan cairan, kemudian didiamkan selama 10 menit.

Kemudian divortex selama 30 detik, dan ditempatkan dalam *water bath* yang berisi 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 mempersiapkan sampel terlebih dahulu. Sampel kemudian di-*centrifuge* (10000 rpm), lalu dilakukan pengenceran (1 ml sampel : 9 ml aquades). Sampel hasil pengenceran sebanyak 0,5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilakukan tahap seperti pada pembuatan kurva standar (larutan fenol 5% dan asam sulfat pekat). Selain itu dibuat larutan blanko dengan campuran aquades 1ml dan dilakukan tahapan 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.

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

Keterangan :

- G : Konsentrasi gula dari kurva standar (mg/ml)  
 FP : Faktor pengenceran  
 W : Berat contoh (mg atau ml).

### 3.5.6 Pengujian Aktifitas Antimikroba dan Perhitungan Zona Hambat (Andries dkk., 2014)

Pengujian aktifitas antimikroba menggunakan sampel minuman probiotik pulpa kakao dan bakteri gram negatif yang diwakili oleh *Escherichia coli* dan bakteri gram positif yang diwakili oleh *Bacillus subtilis*. Pengujian ini dimulai dengan menumbuhkan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis* dengan menggunakan media *natrium broth* (NB). Minuman probiotik pulpa kakao di-*centrifuge* terlebih dahulu untuk kemudian diambil cairannya dan disaring menggunakan *cyringe filter* dengan ketebalan 200 µm. Setelah disaring, cakram ditetesi dengan minuman probiotik pulpa kakao dan ditunggu sampai meresap.

Selanjutnya, media *Natrium Agar* (NA) dibuat dan dituang kedalam cawan petri. *E. coli* atau *B. subtilis* yang tumbuh pada NB diambil 1ml kemudian di swab diatas media NA dan diletakkan cakram yang telah berisi minuman fermentasi pulpa kakao steril sebanyak 2 cakram sebagai pengulangan, serta satu cakram antibiotik (*streptomycin*) sebagai kontrol positif. Cakram tersebut diletakkan dengan jarak antar cakram sekitar 3 cm dan jarak cakram dari tepi cawan adalah 2 cm. Inkubasi dilakukan selama 24 jam, kemudian aktifitas antimikroba dapat diamati berdasarkan terbentuknya zona bening (zona hambat) di sekeliling cakram dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.

Pengukuran zona bening (zona hambat) dilakukan dengan mengambil dua garis yang saling tegak lurus melalui titik pusat cakram. Garis pertama adalah diameter zona hambat horizontal, garis kedua adalah zona hambat vertikal, dan garis ketiga adalah 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 dkk., 2014), dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

- L : Luas zona hambat
- D1 : Diameter zona hambat horizontal
- D2 : Diameter zona hambat vertical
- D3 : Diameter cakram

Diameter zona hambat dapat dikategorikan kekuatannya berdasarkan Surjowardojo dkk (2015) : sangat kuat (zona hambat  $\geq 21$ mm), kuat (zona hambat 11-20mm), sedang (zona hambat 6 – 10 mm) dan lemah (zona hambat  $\leq 5$ mm).

### 3.5.Sensori

Uji sensori yang dilakukan adalah uji hedonik, bertujuan untuk mengetahui tingkat kesukaan pada aroma dan rasa, warna, serta penerimaan keseluruhan dari

minuman probiotik pulpa kakao. Penilaian sensori minuman probiotik pulpa kakao dilakukan oleh panelis yang terdiri dari mahasiswa Fakultas Pertanian sebanyak 30 orang. Sampel yang diuji adalah 10 sampel minuman probiotik pulpa kakao. Sampel dibagi menjadi 2 kelompok pengujian, setiap kelompok terdiri dari 5 sampel. Sampel dituang dalam gelas kecil bening sebanyak 10 ml dan diberi kode acak. Panelis akan diberikan sampel minuman secara bertahap dari kelompok sampel 1 sampai 2 dan air mineral. Selanjutnya panelis diminta untuk memberikan pendapatnya terkait sampel yang dicoba. Panelis juga akan menuliskan gambaran atau deskripsi terkait produk probiotik pulpa kakao ini.



Nama Panelis :  
 Tanggal :  
 Pengujian Produk : Minuman probiotik pulpa kakao

### KUISIONER UJI HEDONIK

#### A. Uji Hedonik

##### Petunjuk Pengisian:

Di hadapan anda disajikan 5 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              | Kode Sampel |     |     |     |     |
|------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|
|                        | 315         | 105 | 290 | 749 | 096 |
| Aroma dan rasa         |             |     |     |     |     |
| Warna                  |             |     |     |     |     |
| Penerimaan Keseluruhan |             |     |     |     |     |

##### Keterangan:

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

#### B. Deskripsi / Gambaran Produk

Saudara/i diminta untuk menuliskan deskripsi atau gambaran dari produk “minuman probiotik pulpa kakao” pada baris yang telah disediakan

|  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |

Nama Panelis :  
 Tanggal :  
 Pengujian Produk : Minuman probiotik pulpa kakao

### KUISIONER UJI HEDONIK

#### A. Uji Hedonik

##### **Petunjuk Pengisian:**

Di hadapan anda disajikan 5 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              | Kode Sampel |     |     |     |     |
|------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|
|                        | 315         | 105 | 290 | 749 | 096 |
| Aroma dan rasa         |             |     |     |     |     |
| Warna                  |             |     |     |     |     |
| Penerimaan Keseluruhan |             |     |     |     |     |

##### **Keterangan:**

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

#### B. Deskripsi / Gambaran Produk

Saudara/i diminta untuk menuliskan deskripsi atau gambaran dari produk “minuman probiotik pulpa kakao” pada baris yang telah disediakan

|  |
|--|
|  |
|  |
|  |
|  |

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan sebagai berikut

1. Berdasarkan data validasi (penelitian ulang) didapatkan bahwa hanya formulasi A yang memiliki data valid jika dibandingkan dengan data hasil penelitian sebelumnya dengan menggunakan RSM.
2. Karakteristik minuman probiotik pulpa kakao pada penelitian ini meliputi log total khamir berkisar antara 7,684-8,101 cell (cfu/ml), antimikroba gram negatif 2,88-4,88 mm, antimikroba gram positif 0,00-2,12 mm, TSS 9,00-11,78 °Brix, Total gula 1,938-3,967%, total asam tertitrasi 1,016-1,146%, pH 3,47-3,48, *flavour* (rasa-aroma) 2,07-3,37, warna 2,75-3,18, dan penerimaan keseluruhan 2,43-3,35. Formulasi terbaik berdasarkan perhitungan AHP pada penelitian ini adalah formula A dan formula B.

### 5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk dilakukannya penyesuaian terkait keasaman media pulpa kakao. Minuman probiotik pulpa kakao dari riset ini memiliki angka asam tertitrasi yang tinggi dan melampaui batas SNI 7552:2009 (Minuman susu fermentasi berperisa).

## DAFTAR PUSTAKA

- Abadl, M. M. T., Marzlan, A. A., Sulaiman, R., Abas, F., and Hussin, A. S. M. 2023. Optimization of coconut milk kefir beverage by RSM and screening of its metabolites and peptides. *Fermentation*. 9(5) : 1-17 <https://doi.org/10.3390/fermentation9050430> (1).
- Adi, N. W., Yusa, N. M., dan Nocianitri, K. A. 2022. Pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik minuman probiotik jus papaya (*Carica papaya* L.) dengan Isolat *Weissella confuse*. F213. *Jurnal ITEPA*. 11 (2) : 362-372.
- Afolabi, M. O., Ibitoye, W. O., and Agbaje, A. F. 2015. Evaluation of nutritional and sensory properties of cocoa pulp beverage supplement with pineapple juice. *Journal of Food Research*. 4 (6) : 58-61. DOI:10.5539/jfr.v4n6p58
- Akbar, R.T.M, Yani Suryani, Iman Hernaman. 2015. Peningkatan nutrisi limbah produksi bioetanol dari singkong melalui fermentasi oleh konsorsium *Saccharomyces cereviseae* dan *Trichoderma viride* *Jurnal Sainteks*. 8 (2) : 1-15
- Aminian, F., Moshirsadri, A., Bahrami, S., Bahrami, S. 2023. Traveler's diarrhea, a serious health threat in the world : a narrative review. *Int J Travel Med Glob Health*. 11 (1) : 234-242.
- Andries, J. R., Gunawan, P. N., & Supit, A. (2014). Uji efek antibakteri ekstrak bunga cengkeh terhadap bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro. *E-GiGi*, 2(2). <https://doi.org/10.35790/eg.2.2.2014.5763>
- Aqil, H., Risdianto, D., Studi, P., Kimia, T., dan Hasyim, U. W. 2016. Isolasi dan pengayaan bakteri *Lactobacillus* dari rumen sapi. *Jurnal Momentum*. 11(2): 93–98.
- A'yuni, N. M., Hidaayah, N., dan Pratiwi, V. N. 2020. Analisis perbedaan waktu fermentasi terhadap kadar probiotik dan aktivitas antioksidan pada minuman probiotik sari buah stroberi (*Fragaria Anannassa*). *Sport and Nutrition Journal*. 2 (2) : 49-55. <https://doi.org/10.15294/spnj.v2i2.39914>

- Azhar, M., 2009. Inulin sebagai prebiotik. *Sainstek*. 12 (1) : 1-8.
- Behera, S. K., Meena, H., Chakraborty, S., and Meikap, B. C. 2018. Application of response surface methodology (RSM) for optimization of leaching parameters for ash reduction from low grade coal. *International Journal of Mining Science and Technology*. 28 : 621-629.
- Boro, I. L. dan Fidyasari, A. 2017. Mutu fisik dan mikrobiologi minuman probiotik sari buah sirsak gunung (*Annona montana Macf*) dengan penambahan *Lactobacillus casei*. *Diploma Thesis*. Akademi Farmasi Putera Indonesia. Malang.
- Budiandari, R. U., Azara, R., Adawiyah, R., Prihatiningrum, A. E. 2023. Studi karakteristik kimia minuman probiotik kombucha sari kulit nanas (*Ananas comosus*). *Teknologi Pangan*. 14 (2) : 181-188.
- Bujna, E., Farkas, N. A., Tran, A. M., Dam, M. S., dan Nguyen, Q. D. 2017. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Food Science Biotechnology* 27: 547-554
- Chan, M. Z. A., Tan, L. T., Heng, S. W. Q., Liu, S. Q. 2023. Effect of co-fermentation of *Saccharomyces boulardii* CNCM-I745 with four different probiotic *Lactobacilli* in coffee brews on cell viabilities and metabolic activities. *Fermentation*. 9 (3) : 1-23.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation9030219>
- Chandrasekaran, M. 2012. *Valorization of food processing by-products*. CRC Press. New West
- Darojat, M. K. 2014. Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman Ekstrak Bawang merah (*Allium cepa* L.) Terhadap Viabilitas Benih Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri. Malang.
- Das, S., Gupta, P. K., & Das, R. R. (2016). Efficacy and Safety of *Saccharomyces boulardii* in Acute Rotavirus Diarrhea: Double Blind Randomized Controlled Trial from a Developing Country. *Journal of Tropical Pediatrics*, 62(6), 464–470. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmw032>
- Dos Santos, C. O., Bispo, E. da S., de Santana L. R. R. , and de carvalho, R. D. S. 2014. Use of cocoa honey (*Theobroma cacao*) for diet jelly preparation : an alternative technology. *Rev. Bras. Frutic*. 36 (3) : 640-648.

- Devi, N. K. A. K., Nocianitri, N. A., Hatiningsih, S. 2022. Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap karakteristik minuman probiotik sari buah nanas madu (*Ananas comosus (L.) Merr*) terfermentasi dengan isolate *Lactobacillus rhamnosus* SKG34. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 11 (3) : 57-92
- Dias, I. A. G. 2022. Use of *Saccharomyces boulardii* In Alcohol-Free Beer Production. *Thesis*. Tecnico Lisboa. Lisbon
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. 1956. Colometric method for determination of sugar and related substance. *Analytical Chemistry*. 3 (28) : 350-356.
- Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S. G., Stateva, L. 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*. 73(8) : 2458-67.
- Febriana, E., dan Prima, R. 2022. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Minuman Probiotik Sari Tomat dengan Kultur Starter *L. plantarum* B1765. *Journal of Chemistry*. 11(2).
- 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.
- Gabriel B.P. dan Riyatno. 1989. *Metarhizium anisopliae (Metch) Sor : Taksonomi, Patologi, Produksi, dan Aplikasinya*. Direktorat Perlindungan Tanaman Perkebunan. Jakarta
- Ganda-Putra, G.P., Harijono, S. Kumalaningsih dan Aulani'am. 2008. Optimasi kondisidepolimerisasi pulp biji kakao oleh enzim poligalakturonase endojinus. *Jurnal Teknik Industri*. 9 (1): 24-34
- Grumezescu, A. M., dan Holban, A. M. (Eds). 2018. *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*. Academic Press. United Kingdom.
- Halim, C. N dan E. Zubaidah. 2013. Studi kemampuan probiotik isolat bakteri asam laktat penghasil eksopolisakarida tinggi asal sawi asin (*Brassica juncea*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 1 (1):129-137

- Hidayatulloh, A., Gumilar, J., dan Harlia, E. 2019. Potensi senyawa metabolit yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 sebagai bahan biopreservasi dan anti bakteri pada bahan pangan asal hewan. *JITP*. 7(2) : 1-6.
- Islahah, N., dan Wikandari, P. R. 2022. Pengaruh lama fermentasi terhadap mutu produk minuman probiotik sari buah belimbing dengan kultur starter *L. plantarum* B1765. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 11 (2) : 89-95.
- Khafifah, M. 2023. 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* Sebagai Starter. *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Universitas Lampung. Lampung
- Khatri, I., Tomar, R., Ganesan, K., Prasad, G. S., Subramanian., S. 2017. Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Scientific Reports*. 7(1)
- Khotimah, K. 2013. Studi Aktivitas Antibakteri Minuman Probiotik Sari Kurma (*Phoenix dactylifera L.*) menggunakan *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus casei* (Kajian Perbandingan Buah: Air dan Konsentrasi Susu Skim). *Skripsi*. Universitas Brawijaya. Malang
- Kurniadi, M. & Suharyono, A. 2010. Pengaruh konsentrasi starter *Streptococcus thermophilus* dan lama fermentasi terhadap karakteristik minuman laktat dari bengkuang (*Pachyrrhizus erosus*). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 3(1) : 51-58.
- 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
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 8 :171–184.
- Lukaszewicz, M. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* Probiotic Yeast. In Rigobelo, E. C. Probiotics. *InTech*.
- Mahyar A, Ayazi P, Pashaei H, Arad B, Oveisi S, Esmaeili S. 2021. The effect of the yeast probiotic *Saccharomyces boulardii* on acute diarrhea in children. *Journal of Comprehensive Pediatrics*. 12(4).

- Marentina, Z. 2023. Pengaruh Konsentrasi Gula Substrat, Lama fermentasi y dan Konsentrasi Inokulum Terhadap Pertumbuhan *Saccharomyces boulardii* Pada Media Fermentasi Pulpa Kakao. *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. Lampung.
- Mazziotta, C.; Tognon, M.; Martini, F.; Torreggiani, E.; Rotondo, J.C. 2023. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. *Cells*. 12 (1) : 184
- Mourey, F., Sureja, V., Kheni, D., & Shah, P. 2020. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in infants and children with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J*. 39(11) : 347–351.  
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002849>
- Mulyani, R., Adi, P., dan Yang, J. J. 2022. Produk fermentasi tradisional Indonesia berbahan dasar pangan hewani (daging dan ikan) : a review. *JAHT: Journal of Applied Agriculture, Health, and Technology*. 1(2) : 34-48.
- 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.
- Mustrari, D., Hamsina., dan Tang, M. 2021. Produksi minuman probiotik hasil fermentasi buah mangga (*Mangifera indica L*) dan sayur kol (*Brassica oleracea L*). *SAINTIS*. 2 (1) : 19-27.
- Nasrun., Jalaluddin., Mahfuddhah. 2015. Pengaruh jumlah ragi dan waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol yang dihasilkan dari fermentasi kulit pepaya. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal*, 4, 1-10.
- Ningsih, R., Rizqiati, 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*. 3(2) : 325-331.
- Novelina., Eliyasmi, R., Ariani, S., Firdausni. 2012. Pengaruh penambahan susu bubuk fullcream terhadap mutu produk minuman fermentasi dari ekstrak ubi jalar merah (*Ipomea batatas L*). *Jurnal Litbang Industri*. 2(2) : 93-102.
- Nurainy, F., Rizal, S., Suharyono, S., dan Umami, E. 2018. Karakteristik minuman probiotik jambu biji (*Psidium guajava*) pada berbagai variasi penambahan sukrosa dan susu skim. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 7(2): 47-54.



- Nurfaillah., Masri., Sari, E. R., Herlinda., dan Patang. 2018. Pemanfaatan limbah pulp kakao menjadi *nata de cacao*. *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. 4 (1) : 24-33.
- Offei, B., Vandecruys, P., De Graeve, S., Fulquié-moreno, M.R., Thevelein, J.M. 2019. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Genome Res.* 29 (9) : 1478–1494.
- Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., and Teixeira, M. C. 2020. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic?. *Journal of Fungi*. 6 (78) : 1-16. <https://doi.org/10.3390/jof6020078>
- Pangaribuan, J. F. Nocianitri, K. A., Darmayanti, L. P. T. 2022. Pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik minuman probiotik saru buah nenas (*Ananas comosus L.*) dengan isolate *Lactobacillus rhamnosus* SKG34. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 11 (4) : 699-711
- Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., and Gil, A. 2019. Mechanisms of action of probiotics. *Adv. Nutr.* 10 : 49-66
- Pranayanti, I. A. P., dan Sutrisno. 2015. Pembuatan minuman probiotik air kelapa muda (*Cocos nucifera L.*) dengan starter *Lactobacillus casei* Shiota strain. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3 (2) : 763-772.
- Pratiwi, W. W., dan Sarbini, D. 2022. Pengaruh suplementasi *Saccharomyces boulardii* terhadap kejadian diare pada balita. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 11 (2) : 125-131.
- Prabudi, M., Nurtama, B., Purnomo, E. H. 2018. Aplikasi response surface methodology (RSM) dengan historical data pada optimasi proses produksi burger. *Jurnal Mutu Pangan*. 5 (2) : 109-115.
- Prasetyo, A. dan Fajarita, L. 2020. Penerapan metode analytical hierarchy process (AHP) dan simple additive weighting (SAW) dalam sistem penunjang Keputusan penentuan guru terbaik pada SMPN 10 Tangerang. *Jurnal IDEALIS*. 3 (2) : 581-586.
- Puerari, C., Magalhães, K. T., & Schwan, R. F. 2012. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*. 48(2) : 634–640. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.005>

- Purwati, L. S. dan Nurhantika S. 2016. Efektivitas penggunaan bioethanol dari limbah pulp kakao (*Theobroma cacao L.*) terhadap lama pembakaran kompor bioethanol. *Jurnal Sains dan Seni ITS* 5 (1) : 2337-3520.
- Putri, N. P. A. N. E., Nocianitri, K. A., dan Wisaniyasa, N. W. 2022. Pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik minuman probiotik sari buah jambu biji merah (*Psidium guahava L.*) dengan isolat *Weisella confuse* F213. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 11 (3) : 542-554.
- Rachmatullah, D., Desiana, N. P., Fiki, H., Noor, H. 2021. Karakteristik biji kakao (*Theobroma cacao L.*) hasil fermentasi dengan ukuran wadah berbeda. *Jurnal Viabel Pertanian*. 15 (1) : 32-44.
- Rizal, S., M. Erna, F. Nurainy, dan A. R. Tambunan. 2016. *Jurnal Kimia Terapan*. Karakteristik probiotik minuman fermentasi laktat sari buah nanas dengan variasi jenis bakteri asam laktat,(18)1:63-71.
- Rohman, A. R., Dwiloka, B., dan Rizqiati, 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.
- Rojas, K. ., Garcia, M. C., Ceron, I. X., Ortiz, R. E., dan Tarazona, M. P. 2020. Identification of potential maturity indicators for harvesting cacao. *Heliyon*. 6 : 1-8
- Safitri, D. 2019. Pengaruh lama fermentasi limbah cair pulp kakao (*Theobroma cacao L.*) sebaga bioherbisida gulma belulang (*Eleusine indica L.*). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri. Lampung.
- Sahara, E., Widjastuti, T., Balia, R. L., Pengajar, S., Sriwijaya, U., Pengajar, S., dan Padjajaran, U. 2018. Pengaruh pemberian kitosan terhadap mikroflora saluran cerna itik tegal. *Pendidikan Matematika Dan IPA*. 9(2): 119–126.
- Saraswati, D. S., Yusmarini., dan Ayu, D. F. 2023. Pemanfaatan ekstrak kulit buah naga merah sebagai pewarna alami minuman probiotik sari buah sirsak. *Jurnal Teknologi Pangan*. 14 (1) : 48-58.
- Sarjono, P. R., Mulyani, N. C., Noprastika, I., Ismiyanto., Ngadiwiyana, dan Prasetya, N. B. A. 2021. Pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas *Saccharomyces cerevisiae* dalam menghidrolisis enceng gondok (*Eichhornia crassipes*). *Jurnal Penelitian Saintek*. 2(26) : 95-108.

- Senkarcinova, B., Dias, I. A. G., Nesor, J., and Branyik, T. 2019. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Lebensmittel-Wissenschaft+Technologie*. 100 : 362-367.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.082>
- Sinaga, C.M. 2007. Pengaruh Konsentrasi Susu Skim dan Konsentrasi Sukrosa terhadap Karakteristik Yoghurt Jagung (*Zea mays L.*). *Skripsi*. Universitas Pasundan. Bandung.
- Sood, S., Ringhal R., Bhat, S., Kumar, A. 2011. *Comprehensive Biotechnology* (third Edition). Pergamon. United Kingdom.
- St. Sabahanur dan Andi Ralle. 2018. Peningkatan kadar alkohol, asam dan polifenol limbah cairan pulp kakao dengan penambahan sukrosa dan ragi. *Jurnal Industri Hasil Perkebunan* 13 (1) : 53.
- Surjowardojo, Susilawati, T.E. dan Gabriel, R.S. 2015. Daya hambat dekok kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill.*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas sp.* penyebab mastitis pada sapi perah. *J. Ternak tropika*. 16(2) : 40-48.
- Suryani, Y., Hernaman, I., dan Ningsih. 2017. Pengaruh penambahan urea dan sulfur pada limbah padat bioethanol yang difermentasi EM-4 terhadap kandungan protein dan serat kasar. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 5(1) : 13-17.
- Sunaryanto, R., Martius, E. dan Marwoto, B. 2014. Uji kemampuan *Lactobacillus casei* sebagai agensia probiotik. *Bioteknologi dan Biosains Indonesia*. 1(1): 9–14.
- Sultan, R. A., Lahming., dan Sukainah, A. 2022. Karakteristik minuman probiotik kombinasi sari buah nenas (*Ananas comosus L.*) dan papaya (*carica papaya L.*). *Jurnal Pendidikan Teknologi Pangan*. 8 (1) : 37-46.
- Suprihatin. 2010. *Teknologi Fermentasi*. UNESA University Press. Surabaya
- Sutrisna, R., Ekowati, N., & Rahmawati, D. 2017. Uji daya hambat isolat bakteri asam laktat usus itik (*Anas domestica*) pada bakteri gram positif dan pola pertumbuhan isolat bakteri usus itik pada media Mrs Broth. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 13(1) : 52-59
- Suryono, I. A. & Wikandari, P. R., 2019. Profil Produksi Short Chain Fatty Acids. *UNESA Journal of Chemistry*. 8(2):92-97.

- Susanto, F.X. 1994. *Tanaman Kakao Budidaya dan Pengolahan Hasil*. Kanisius. Yogyakarta.
- Tampinongkol, N. C., Nocianitri, K. A., Ekawati, I. G. A. 2020. Pengaruh konsentrasi sukrosa terhadap karakteristik minuman probiotik sari buah terung belanda terfermentasi dengan *Lactobacillus rhamnosus* SKG34. *Jurnal Itepa*. 9 (3) : 251-261
- Tefa, P., Ledo, M. E. S., dan Nitsae, M. 2023. Variasi konsentrasi *Saccharomyces cerevisiae* dalam pembuatan wine buah dilak (*Limonia acidissima*). *Journal Sciscitatio*. 4 (1) : 32-38. <https://doi.org/10.21460/sciscitatio.2023.41.112>
- Tomičić, Z., Colovic, R., Cabarkapa, I., Vukmirovic, D., Djuragic, O., Tomičić, R. 2016. Beneficial properties of probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Food and Feed Research*. 43(2):103-110.
- Wang, R., Sun., J., Lissabliere, B., Yu, B., Liu, A. Q. 2022. Green tea fermentation with *Saccharomyces boulardii* CNCM-I745 and *Lactiplantibacillus plantarum* 299V. *Food Science and Technology*. 157 : 1-9.
- Wardani, A. F. K. 2019. Karakterisasi morfologi tanaman kakao (*Theobroma cacao*) hibrida F1 lindak di wisata edukasi kampung coklat blitar sebagai sumber belajar biologi. *Skripsi*. Fakultas Tarbiyah dan Ilmu Keguruan. Institut Agama Islam Negeri. Tulungagung.
- 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. *Tesis*. Universitas Lampung. Lampung
- Widyantara, I. W. A., Nocianitri, K. A., Hapsari, N. M. I. 2020. Pengaruh lama fermentasi terhadap karakteristik minuman probiotik sari buah sirsak. *Jurnal Itepa*. 9 (2) : 151-160.
- Widyaningsih, E. N. 2011. Peran probiotik untuk kesehatan. *Jurnal Kesehatan*. 4(1): 14–20.
- Xu, X., Bao, Y., Wu, B., Lao, F., Hu, X., dan Wu, J. 2019. Chemical snalysis and flavor properties of blended orange, carrot, apple, and chinese jujube juice fermented byselenium-enriched probiotics. *Food Chemistry* 289: 250-258.

- Yuliana, N., Nurainy, F., Sari, G. W., Sumardi., Widiastuti, E. L. 2023. Total microbe, physicochemical property and antioxidative activity during fermentation of cocoa honey into kombucha functional drink. *Applied Food Research*. 3 (1) : 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100297>
- Yuliana, N., Nurainy, F., dan Sumardi. 2022. *Pengolahan Hasil Samping Buah Kakao*. Pusaka Media. Bandar Lampung
- Yunus, Y. dan 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.
- Ziska, R., Adit, T., Dadih, S. 2017. Uji aktivitas antimikroba dan antioksidan dari minuman probiotik hasil fermentasi air kelapa (*cocos nucifera*). *Jurnal Farmasi Galenika*. 4 (1) : 14-19.