

**KEMAMPUAN KHAMIR ASAL BIJI COKLAT
(*Theobroma cacao* L.) SENTUL HASIL FERMENTASI
SEBAGAI AGEN PROBIOTIK**

Skripsi

**Disusun untuk memenuhi salah satu syarat
memperoleh gelar Sarjana Sains**



Siti Nurkhasanah

1308617003

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
2022**

ABSTRAK

Siti Nurkhasanah. KEMAMPUAN KHAMIR ASAL BIJI COKLAT (*Theobroma cacao* L.) SENTUL HASIL FERMENTASI SEBAGAI AGEN PROBIOTIK.

Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta. Dibawah Bimbingan SUKMAWATI, RAHAYU.

Probiotik merupakan mikroorganisme yang apabila diberikan dalam jumlah yang memadai, akan memberikan manfaat kesehatan pada inangnya. Mikroorganisme probiotik dapat berasal dari khamir. Khamir dapat ditemukan pada produk fermentasi salah satunya fermentasi biji coklat. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat khamir asal biji coklat Sentul hasil fermentasi sebagai agen probiotik dan identitasnya. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat khamir UNJCC asal biji coklat Sentul hasil fermentasi. Metode yang digunakan yaitu metode eksperimen untuk uji toleransi asam lambung pH 2 (3 jam) dan garam empedu (0%, 0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%) dan uji aktivitas antibakteri terhadap *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella enteritidis*. Metode deskriptif digunakan untuk analisis morfologi khamir secara makroskopik dan mikroskopik, identifikasi molekular khamir, dan uji hemolitik. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dianalisis menggunakan ANAVA dua arah serta dilanjutkan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) 5%. Hasil skrining khamir pada suhu 37 °C dan pH 2 didapatkan 10 isolat khamir yang mampu tumbuh. Uji dilanjutkan terhadap 3 isolat yaitu C6.4.4 (UNJCC Y-155), C6.4.12 (UNJCC Y-156), dan C6.5.6 (UNJCC Y-157) yang dipilih berdasarkan perbedaan morfologi. Hasil identifikasi daerah D1/D2 rDNA dengan primer NL1 dan NL4 diperoleh identitas UNJCC Y-155 sebagai *Pichia kudriavzevii* (homologi 99,75%), UNJCC Y-156 sebagai *Pichia kudriavzevii* (homologi 99,82%) dan UNJCC Y-157 sebagai *Pichia cecembensis* (homologi 97,81%). Uji toleransi asam lambung pH 2 selama 3 jam dan garam empedu menunjukkan semua isolat dapat bertahan hidup dengan persentase bertahan hidup diatas 70%. Isolat *P. cecembensis* UNJCC Y-157 memiliki persentase bertahan hidup terbaik yaitu 95,89% pada paparan garam empedu 2%. Uji aktivitas antibakteri menunjukkan semua isolat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *L. monocytogenes* dan *S. enteritidis*. Uji aktivitas hemolitik menunjukkan semua isolat tidak melisis sel darah merah pada media uji *blood agar*. Berdasarkan seluruh uji yang dilakukan sebagai syarat probiotik seluruh isolat berpotensi sebagai mikroorganisme probiotik.

Kata kunci: *Fermentasi biji coklat, probiotik, asam lambung, garam empedu antibakteri, aktivitas hemolitik*

ABSTRACT

Siti Nurkhasanah. THE ABILITY OF YEAST FROM CACAO BEANS (*Theobroma cacao* L.) FERMENTATION FROM SENTUL AS A PROBIOTIC AGENT. Biology Study Program, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Jakarta State University. Under the guidance of SUKMAWATI, RAHAYU.



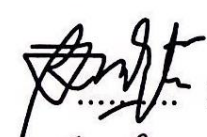
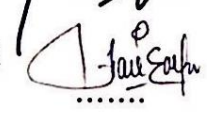


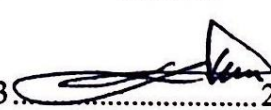
Probiotics are microorganisms which, when administered in sufficient quantities, provide health benefits to the host. Probiotic microorganisms can come from yeast. Yeast can be found in fermented products, one of which is cocoa bean fermentation. The aim of the study was to obtain yeast isolates from Sentul cocoa beans fermented as probiotic agents and their identity. The sample used in this study was UNJCC yeast isolate from fermentation of cacao beans from Sentul. The method used is an experimental method to tolerance of gastric acid pH 2 (3 hours) and bile salts test (0%, 0.5%, 1%, 1.5%, and 2%) and antibacterial activity test against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* and descriptive methods were used for macroscopic and microscopic analysis of yeast morphology, yeast molecular identification, and hemolytic test. The research design used a completely randomized design (CRD) and analyzed using two-way ANOVA and continued with the 5% *Duncan Multiple Range Test* (DMRT). There were 10 isolates that were able to grow at 37 °C and pH 2. The test was continued on 3 isolates, namely C6.4.4 (UNJCC Y-155), C6.4.12 (UNJCC Y-156), and C6.5.6 (UNJCC Y-157) which were selected based on morphological differences. The results of identification of the D1/D2 rDNA region with primers NL1 and NL4 obtained the identity of UNJCC Y-155 as *Pichia kudriavzevii* (homology 99.75%), UNJCC Y-156 as *Pichia kudriavzevii* (homology 99.82%) and UNJCC Y-157 as *Pichia cecembensis* (homology 97.81%). Tolerance test of gastric acid pH 2 for 3 hours and bile salts showed that all isolates could survive with survival percentage up to 70%. The isolate of *P. cecembensis* UNJCC Y-157 had the highest survival rate 95.89% on exposure to 2% bile salts. Antibacterial activity test showed that all isolates could inhibit the growth of *L. monocytogenes* and *S. enteritidis*. Hemolytic activity test showed that all isolates did not lyse red blood cells with blood agar test media. Based on all the tests carried out as probiotic requirements, all isolates had the potential as probiotic microorganisms.

Keywords: *Cocoa bean fermentation, probiotics, stomach acid, bile salt, antibacterial, hemolytic activity*

LEMBAR PENGESAHAN

KEMAMPUAN KHAMIR ASAL BIJI COKLAT (*Theobroma cacao* L.) SENTUL HASIL FERMENTASI SEBAGAI AGEN PROBIOTIK

Nama : Siti Nurkhasanah
Nomor Registrasi : 1308617003

	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Penanggung Jawab			
Dekan	: Prof. Dr. Muktiningsih N.M. NIP. 19640511 198903 2 001		25/02/2022
Wakil Penanggung Jawab			
Wakil Dekan I	: Dr. Esmar Budi, S.Si., MT NIP. 19720728 199903 1 002		24/02/2022
Ketua	: Dr. Reni Indrayanti, M.Si NIP. 19621022 199803 2 002		21/02/2022
Sekretaris/Penguji I	: Dr. Tri Handayani Kurniati, M.Si NIP. 196660316 199203 2 001		19/02/2022
Anggota			
Pembimbing I	: Dr. Dalia Sukmawati, M.Si NIP. 19730914 200604 2 001		19/02/2022
Pembimbing II	: Ns. Sri Rahayu, S. Kep., M. Biomed NIP. 19790925 200501 2 002		20/02/2022
Penguji II	: Dr. Adisyahputra, M.S NIP. 196011111 198703 1 003		20/02/2022

Dinyatakan lulus ujian skripsi pada tanggal 17 Februari 2022

LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Saya mengatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi saya dengan judul **“Kemampuan Khamir Asal Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) Sentul Hasil Fermentasi Sebagai Agen Probiotik”** yang disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dari Program Studi Biologi Universitas Negeri Jakarta adalah karya ilmiah saya dengan arahan dari dosen pembimbing.

Sumber informasi yang diperoleh dari penulisan lain telah dipublikasikan yang disebutkan dalam teks skripsi ini, telah dicantumkan dalam Daftar Pustaka sesuai dengan norma, kaidah dan etika penulisan ilmiah.

Jika dikemudian hari sebagian besar skripsi ini bukan hasil karya saya sendiri dalam bagian-bagian tertentu, saya bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang saya sanding dan sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Jakarta, 18 Februari 2022

Pembuat pernyataan



Siti Nurkhasanah

1308617003



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS NEGERI JAKARTA
UPT PERPUSTAKAAN

Jalan Rawamangun Muka Jakarta 13220
Telepon/Faksimili: 021-4894221
Laman: lib.unj.ac.id

LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Negeri Jakarta, yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Siti Nurkhasanah
NIM : 1308617003
Fakultas/Prodi : FMIPA / Biologi
Alamat email : sitinurkhasanah68@gmail.com

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada UPT Perpustakaan Universitas Negeri Jakarta, Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif atas karya ilmiah:

Skripsi Tesis Disertasi Lain-lain (.....)

yang berjudul : Kemampuan Khamir Asal Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) Sentul Hasil Fermentasi Sebagai Agen Probiotik

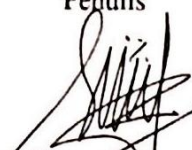
Dengan Hak Bebas Royalti Non-Eksklusif ini UPT Perpustakaan Universitas Negeri Jakarta berhak menyimpan, mengalihmediakan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di internet atau media lain secara *fulltext* untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta ijin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan atau penerbit yang bersangkutan.

Saya bersedia untuk menanggung secara pribadi, tanpa melibatkan pihak Perpustakaan Universitas Negeri Jakarta, segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran Hak Cipta dalam karya ilmiah saya ini.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Jakarta 22 Februari 2022

Pepulis


(Siti Nurkhasanah)
nama dan tanda tangan

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmaanirahiim

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini yang berjudul **“Kemampuan Khamir Asal Biji Coklat (*Theobroma cacao* L.) Sentul Hasil Fermentasi Sebagai Agen Probiotik”**. Sholawat dan salam semoga selalu tercurah untuk Nabi Muhammad SAW serta keluarga, sahabat dan para pengikutnya.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana sains. Selama penyusunan skripsi ini penulis mendapat banyak sekali pengalaman dan pembelajaran yang bermanfaat baik dalam teori maupun kemampuan dalam bidang biologi. Selain itu, saya menyadari bahwa proses penyusunan skripsi ini mendapat bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dan secara materil maupun non materil. Pertama penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Dalia Sukmawati, M.Si, selaku pembimbing 1 yang telah meluangkan waktu, tenaga, memberikan bimbingan, saran, motivasi dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis selama berkuliah di Prodi Biologi Universitas Negeri Jakarta. Kedua kepada Ibu Ns. Sri Rahayu, M.Biomed, selaku pembimbing 2 yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, motivasi, wawasan dan kesabaran untuk membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Tim penguji hasil penelitian yaitu Ibu Dr. Tri Handayani Kurniati, M.Si dan Bapak Dr. Adisyahputra, Ms yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam proses penulisan skripsi ini. Ibu Dr. Reni Indrayanti, M.Si selaku Koordinator Prodi Biologi FMIPA UNJ yang telah mengajarkan kejujuran, kedisiplinan, dan tanggung jawab. DRPM Kemenristekdikti, Hibah Penelitian Terapan Unggulan Perguruan tinggi (PTUPT) 2021-2022, Laboratorium Mikrobiologi dan Universitas Negeri Jakarta *Culture Collection* (UJNCC) yang telah memberikan fasilitas pada penelitian ini.

Penulis juga tidak lupa mengucapkan terima kasih kepada kedua orang tua, Mama dan Papa yang selalu memberikan dukungan moril dan materil, menyemangati dan

memberikan doa serta restu yang tiada henti kepada penulis dalam menempuh pendidikan. Semoga Allah selalu melindungi dan memberkahi kehidupan kalian. Kakak dan adik dari penulis yang telah memberikan semangat dan dukungan dalam proses penulisan skripsi ini.

Rekan seperjuangan skripsi mikrobiologi yang sudah penulis anggap sebagai keluarga kedua yaitu Umi Khumaiya, Allika Firhandini, Fira Tafrijyyah, Rapika Sari, Aldi Setiawan, dan Noer Syahbani, kakak-kakak yaitu Zakiah Nur Afifah, Zico Arman, Rifdah Hasanah, Mutia Balqis, Gibran Sondana, Nabilah Nov Fikriyah, Denika Dellanera, Aditya Risandi, dan adik-adik yaitu Desty Saszieta, Salsabila Fauzi M. dan Almira Marvella P. yang telah senantiasa membantu penulis dalam menjalani hari-hari dan kesibukkan di laboratorium mikrobiologi selama penelitian. Sahabat baik saya dari Biologi A 2017 yaitu Ananda Nuri Savira yang selalu memberikan saran, motivasi dan dukungan dari awal MPA hingga kelulusan penulis. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada penulis sendiri karena telah berjuang, sabar dan bertahan hingga akhir dalam menempuh semua masalah dan drama dalam menuju kelulusan sebagai sarjana sains.

Saya berharap tulisan yang sederhana ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan, untuk itu penulis mohon maaf, kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak sangat penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa menambahkan ilmu kepada kita semua, Amin.

Jakarta, 18 Februari 2022

Pembuat pernyataan

Siti Nurkhasanah

1308617003

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
E. Hipotesis Penelitian	4
BAB II KAJIAN PUSTAKA	5
A. Fermentasi Biji Coklat (<i>Theobroma cacao</i> L.).....	5
B. Mikroorganisme Probiotik.....	7
C. Seleksi Probiotik.....	9
D. Khamir Potensial Probiotik	11
E. Identifikasi Molekular Khamir	13
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	15
A. Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
B. Metode Penelitian	15
C. Alat dan Bahan	15
D. Sampel Penelitian	16
E. Prosedur Penelitian	17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
A. Peremajaan Isolat Khamir.....	25
B. Kemampuan Tumbuh Isolat Khamir pada Suhu 37 °C dan pH 2.....	26
C. Identifikasi Molekular dan Karakterisasi Morfologi	28
D. Ketahanan Khamir terhadap Asam Lambung pH 2 dan Garam Empedu	33
E. Aktivitas Antibakteri Khamir	36
F. Aktivitas Hemolitik Khamir	38
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	52
DAFTAR RIWAYAT HIDUP.....	74

DAFTAR TABEL

Halaman

1. Karakteristik morfologi isolat khamir yang mampu tumbuh pada pH 2 waktu inkubasi 24 jam, suhu 30°C.....	27
2. Hasil analisis homologi dengan program BLAST Isolat UNJCC-Y-155, UNJCC-Y 156, dan UNJCC-Y 157 berdasarkan analisis sekuen daerah D1/D2 rDNA.....	29
3. Pengamatan makroskopis khamir UNJCC Y-155, UNJCC Y-156 dan UNJCC Y-156 pada medium YMA umur 48 jam, dan inkubasi suhu 30°C.....	31
4. Pengamatan mikroskopis khamir UNJCC Y-155, UNJCC Y-156 dan UNJCC Y-156 pada medium YMA umur 48 jam, dan inkubasi suhu 30°C	31
5. Persentase bertahan hidup isolat khamir pada pH 2 selama 3 jam dan konsentrasi garam empedu (0,5%.1%,1,5%,2%) umur 24 jam pada suhu 37°C.....	34
6. Hasil zona penghambatan dari Aktivitas Uji Antibakteri terhadap <i>L. monocytogenes</i> dan <i>S. enteritidis</i>	36
7. Hasil skrining khamir asal fermentasi biji coklat sentul pada suhu 37 °C	55
8. Hasil skrining khamir asal fermentasi biji coklat sentul pada suhu pH 2... ..	58
9. Hasil uji asam lambung pH 2 selama 3 jam dengan garam empedu.....	66
10. Hasil zona penghambatan pada pengujian aktivitas antibakteri	67
11. Hasil uji anava dua arah <i>univariate</i> persentase bertahan hidup khamir (%).....	68
12. Hasil uji <i>Duncan Multiple Range Test</i> (DMRT) faktor interaksi isolat dan konsentrasi garam empedu terhadap persentase bertahan hidup.....	69
13. Hasil log CFU/mL pada uji asam lambung pH 2 selama 0,1,2, dan 3 jam dengan konsentrasi garam empedu 0%,0,5%,1%,1,5%,2%.....	70
14. Hasil persentase bertahan hidup pada uji asam lambung pH 2 selama 0,1,2, dan 3 jam dengan konsentrasi garam empedu 0%,0,5%,1%,1,5%,2%.....	71
15. Hasil uji anava dua arah <i>univariate</i> zona penghambatan (mm).....	72
16. Hasil uji <i>Duncan Multiple Range Test</i> (DMRT) faktor interaksi isolat khamir dan jenis bakteri terhadap zona penghambatan	73

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Gambar fermentasi biji coklat.....	6
2. Bagan alir penelitian... ..	17
3. Hasil peremajaan isolat khamir asal fermentasi biji coklat Sentul.....	25
4. Hasil skrining khamir asal biji coklat fermentasi Suhu 37 °C	26
5. Hasil skrining pH 2 terhadap isolat khamir asal biji coklat fermentasi.....	28
6. Pohon filogenetik isolat UNJCC-Y-155, UNJCC-Y 156, dan UNJCC-Y 157 berdasarkan analisis sekuen daerah D1/D2 rDNA.....	30
7. Morfologi makroskopik dan mikroskopik khamir umur 48 jam pada medium YMA, inkubasi suhu 30°C	32
8. Hasil uji aktivitas antibakteri	37
9. Hasil uji aktivitas hemolitik... ..	38
10. Hasil amplifikasi khamir asal fermentasi biji coklat sentul	59
11. Kromatogram daerah D1/D2 rDNA Isolat UNJCC Y-155 dengan primer NL1.	60
12. Kromatogram daerah D1/D2 rDNA Isolat UNJCC Y-155 dengan primer NL4.	61
13. Kromatogram daerah D1/D2 rDNA Isolat UNJCC Y-156 dengan primer NL1.	62
14. Kromatogram daerah D1/D2 rDNA Isolat UNJCC Y-156 dengan primer NL4.	63
15. Kromatogram daerah D1/D2 rDNA Isolat UNJCC Y-157 dengan primer NL1.	64
16. Kromatogram daerah D1/D2 rDNA Isolat UNJCC Y-157 dengan primer NL4.	65