

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT  
DARI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*) SEBAGAI  
KANDIDAT PROBIOTIK**

**Skripsi**



**Maria Trivonia Sema**

**31160023**

**Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta  
2020**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT  
DARI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*) SEBAGAI  
KANDIDAT PROBIOTIK**

**Skripsi**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Pada Program Studi Biologi, Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana



**Maria Trivonia Sema  
31160023**

**Program Studi Biologi  
Fakultas Bioteknologi  
Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta  
2020**

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI**  
**SKRIPSI/TESIS/DISERTASI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Kristen Duta Wacana, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maria Trivonia Sema  
NIM : 31160023  
Program studi : Biologi  
Fakultas : Bioteknologi  
Jenis Karya : Skripsi/~~Tesis~~/Disertasi (tulis salah satu)

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Kristen Duta Wacana **Hak Bebas Royalti Noneksklusif** (*None-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

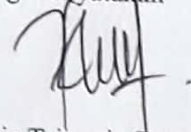
**“ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI BIJI  
KAKAO (*Theobroma cacao*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK”**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti/Noneksklusif ini Universitas Kristen Duta Wacana berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama kami sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Yogyakarta  
Pada Tanggal : 21 Agustus 2020

Yang menyatakan



(Maria Trivonia Sema)  
NIM.31160023

## Lembar Pengesahan

Skripsi dengan judul:

### **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI BIJI KAKAO (*Theobroma cacao*) SEBAGAI KANDIDAT PROBIOTIK**

telah diajukan dan dipertahankan oleh:

**MARIA TRIVONIA SEMA**

**31160023**

dalam Ujian Skripsi Program Studi Biologi

Fakultas Bioteknologi

Universitas Kristen Duta Wacana

dan dinyatakan DITERIMA untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar

Sarjana Sains pada tanggal 11 Agustus 2020

**Nama Dosen**

**Tanda Tangan**

1. Dr. Charis Amarantini, M.Si.  
(Ketua Tim Penguji / Dosen Pembimbing I / Dosen Penguji I)
2. Vinsa Cantya Prakasita drh. M.Sc  
(Dosen Pembimbing II / Dosen Penguji II)
3. Tri Yahya Budiarmo, S.Si., MP  
(Dosen Penguji III)

**Yogyakarta, 11 Agustus 2020**

**Disahkan Oleh:**

Dekan,



Drs. Kusworo, M.Sc

Ketua Program Studi,

Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si

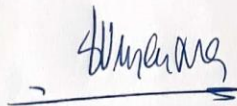
**LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI**

Judul : Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao  
(*Theobroma cacao*) sebagai Kandidat Probiotik

Nama Mahasiswa : Maria Trivonia Sema  
Nomor Induk Mahasiswa : 31160023  
Hari/Tanggal Ujian : 11 Agustus 2020

Disetujui oleh :

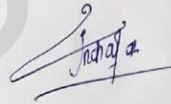
Pembimbing I,



(Dr. Charis Amarantini, M.Si.)

NIK : 914 E 155

Pembimbing 2,



(Vinsa Cantya Prakasita, drh., SKH., M.Sc.)

NIK : 194 KE 423

Ketua Program Studi Biologi



(Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si.)

NIK : 884 E 075

## LEMBAR PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maria Trivonia Sema

NIM :31160023

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi dengan judul:

**“ Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Kandidat Probiotik”**

adalah hasil karya saya dan bukan merupakan duplikasi sebagian atau seluruhnya dari karya orang lain, yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu di dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya secara sadar dan bertanggung jawab dan saya bersedia menerima sanksi pembatalan skripsi apabila terbukti melakukan duplikasi terhadap skripsi atau karya ilmiah lain yang sudah ada.

Yogyakarta, 11 Agustus 2020



(Maria Trivonia Sema)

NIM : 31160023

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur hanya bagi Tuhan, oleh karena anugerah-Nya yang besar serta kemurahan dan kasih setiaNya yang melimpah, penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Kandidat Probiotik.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan karena keterbatasan yang ada. Oleh karena itu, penulis membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran berupa kritik dan saran yang bersifat membangun supaya skripsi ini menjadi semakin sempurna dan bermanfaat. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Charis Amarantini, M.Si. dan Ibu Vinsa Cantya Prakasita, drh., SKH., M.Sc. selaku pembimbing I dan pembimbing II yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan kasih sayang seperti anak sendiri.
2. Kedua Orang Tua ( Bapa Edy Sema dan Mama Rofina Tin) yang telah mengasihi, menyayangi, mencintai, memberikan doa, perhatian, dukungan moral dan materil secara tulus dan ikhlas selama ini.
3. Semua laboran yang selalu membantu dalam penelitian di Laboratorium Biologi UKDW.
4. Mingguas, Viona dan Lidia yang selalu menemani dari awal penelitian hingga penelitian selesai.
5. Semua Angkatan 2016 yang selalu memberi semangat
6. Krismelan, Paskalina, Diana dan Nata yang sudah membantu dalam proses penelitian di laboratorium.
7. Any, Prika, Yatni, Lany dan Tetik yang selalu membantu dan memberikan semangat.

Kiranya skripsi ini bermanfaat bagi pembaca. Terima kasih.

Yogyakarta, 06 Juni 2020

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL DEPAN.....	i
HALAMAN JUDUL BAGIAN DALAM .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK .....	xii
ABSTRACT.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1.Latar belakang .....	1
1.2.Perumusan Masalah .....	2
1.3.Tujuan .....	2
1.4.Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1. Fermentasi Biji Kakao .....	4
2.2. Bakteri Asam Laktat .....	6
2.3. Potensi Probiotik Bakteri Asam Laktat pada Fermentasi Biji Kakao .....	8
BAB III METODE PENELITIAN .....	10
1.1.Waktu dan Lokasi Penelitian .....	10
1.2.Alat .....	10
1.3.Bahan .....	11
1.4.Cara Kerja .....	11
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	16
4.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Alami Biji Kakao .....	16
4.2. Analisa Fenotip Bakteri Asam Laktat.....	17



4.3. Seleksi Kandidat Bakteri Asam Laktat sebagai Probiotik .....	21
4.4. Identifikasi bakteri asam laktat berdasarkan uji API 50 CHL .....	26
<b>BAB V KESIMPULAN</b> .....	<b>31</b>
5.1. Isolasi Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Alami Biji Kakao .....	31
5.2. Kesimpulan dan Saran .....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>34</b>

©UKDWN

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Hasil uji fenotipe isolat bakteri asam laktat dari biji kakao .....	18
Tabel 4.2. Skrining Bakteri Asam Laktat sebagai Kandidat Probiotik .....	22
Tabel 4.3. Hasil Identifikasi API 50 CHL Isolat Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao .....	27
Tabel 4.4. Hasil identifikasi isolat BAL strain K1B1, K2T2 dan K3B4 berdasarkan uji API 50 CHL .....	27

©UKDWN

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Buah, pulp, dan biji dari tanaman kakao .....	5
Gambar 3.1. Gambar <i>fishbone</i> .....	11
Gambar 4.1. Sampel buah kakao .....	16
Gambar 4.2. Koloni bakteri asam laktat yang tumbuh di media MRS-CaCO <sub>3</sub> .....	17
Gambar 4.3. Hasil pengecatan gram dari isolat BAL .....	18
Gambar 4.4. Hasil uji katalase dari isolat BAL .....	19
Gambar 4.5. Hasil uji produksi gas dari isolat BAL.....	20
Gambar 4.6. Hasil uji motilitas dari isolat BAL.....	20
Gambar 4.7. Hasil uji ketahanan pada suhu 10°C dan 45 °C dari isolat BAL.....	21
Gambar 4.8. Hasil uji ketahanan terhadap asam dari isolat BAL.....	23
Gambar 4.9. Hasil uji ketahanan terhadap garam empedu dari isolat BAL .....	24
Gambar 4.10. Hasil uji aktivitas antimikrobia dari isolat BAL.....	25

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Pertumbuhan dan Pembentukan Zona Terang BAL .....	34
Lampiran 2. Hasil uji ketahanan terhadap asam .....	35
Lampiran 3. Hasil uji ketahanan terhadap garam empedu .....	36
Lampiran 4. Hasil uji aktivitas antimikrobia .....	38
Lampiran 5. Hasil Konfirmasi BAL menggunakan kit API 50 CHL .....	48
Lampiran 6. Hasil Konfirmasi BAL melalui APIweb .....	48

©UKDWN

## ABSTRAK

### “Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Biji Kakao (*Theobroma cacao*) sebagai Kandidat Probiotik”

MARIA TRIVONIA SEMA

Tanaman kakao merupakan salah satu tanaman yang banyak dijumpai di Indonesia. Biji kakao merupakan salah satu bagian dari tanaman kakao yang paling banyak dimanfaatkan. Biji kakao diselubungi oleh lendir yang kaya akan kandungan karbohidrat oleh karenanya dapat menjadi media yg baik untuk bakteri asam laktat (BAL) tumbuh. Bakteri asam laktat memiliki potensi sebagai probiotik yang sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi BAL pada fermentasi biji kakao dan mengetahui strain BAL yang memiliki potensi sebagai probiotik. Bakteri asam laktat sebagai probiotik diseleksi melalui uji ketahanan asam, uji ketahanan terhadap garam empedu dan uji aktivitas antimikrobia. Bakteri asam laktat yang terseleksi memiliki potensi sebagai probiotik diidentifikasi menggunakan API 50 CHL. Hasil dari studi ini menunjukkan isolat bakteri K1A1, K1B1, K2T2 dan K3B4 mampu bertahan pada pH lambung (pH 2,5, pH 3 dan pH 4), mampu bertahan pada garam empedu (0,3%, 0,5 % dan 1 %) serta memiliki kemampuan antimikrobia melawan bakteri Gram-positif yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 serta bakteri Gram-negatif yaitu *Salmonella typhi* NCTC 786 dan *Salmonella typhi* BPE 122.4CCA. Keempat isolat diseleksi berdasarkan kemampuan antimikrobia yang paling baik. Tiga isolat yang memiliki kategori zona hambat sedang, yaitu isolat K1B1, K2T2 dan K3B4 sedangkan isolat K1A1 memiliki kategori zona hambat yang rendah, sehingga isolat K1B1, K2T2 dan K3B4 diidentifikasi lebih lanjut. Hasil identifikasi isolat K1B1, K2T2 dan K3B4 berdasarkan uji API 50 CHL menunjukkan bahwa ketiga isolat tersebut merupakan spesies *Lactobacillus plantarum* 1 (99,9%)

Kata kunci: Bakteri asam laktat, biji kakao, isolasi dan identifikasi, probiotik, *Lactobacillus plantarum*

## ABSTRACT

### **”Isolation and Identification of Lactic Acid from Cacao Beans (*Theobroma cacao*) as Probiotic Candidates”**

MARIA TRIVONIA SEMA

The cocoa plant is one of the most common plants in Indonesia. Cocoa beans are one of the most widely used parts of the cocoa plant. Cocoa beans are covered with mucus which is rich in carbohydrates, therefore it can be a good medium for lactic acid bacteria (LAB) to grow. Lactic acid bacteria have potential as probiotics which are very beneficial for human health. The purpose of this study was to identify LAB in cocoa bean fermentation and to determine LAB strains that have potential as probiotics. Lactic acid bacteria was selected by using acid resistance test, bile salt resistance test and antimicrobial activity test. Lactic acid bacteria that were selected as potential probiotics were identified using API 50 CHL. The results of this study showed that bacterial isolates K1A1, K1B1, K2T2 and K3B4 were able to survive gastric pH (pH 2.5, pH 3 and pH 4), able to survive on bile salts (0.3%, 0.5% and 1%. ) and has the ability to antimicrobial against Gram-positive bacteria, namely *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and Gram-negative bacteria, namely *Salmonella typhi* NCTC 786 and *Salmonella typhi* BPE 122.4CCA. The four isolates were selected based on the best antimicrobial ability. Three isolates had a moderate inhibition zone category, namely isolates K1B1, K2T2 and K3B4 while isolates K1A1 had a low zone of inhibition category, so isolates K1B1, K2T2 and K3B4 were further identified. The results of the identification of isolates K1B1, K2T2 and K3B4 based on the API 50 CHL test showed that the three isolates were *Lactobacillus plantarum* 1 species (99.9%)

Key words: Lactic acid bacteria, cocoa beans, isolation and identification, probiotics, *Lactobacillus plantarum*

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar belakang

Buah kakao banyak diminati oleh masyarakat Indonesia. Biji kakao merupakan salah satu bagian dari tanaman kakao yang paling banyak dimanfaatkan. Indonesia mampu menduduki peringkat ketiga sebagai produsen biji kakao terbanyak di dunia (Purwanto *et al.*, 2019). Produksi kakao yang tinggi harus diiringi dengan kualitas biji kakao yang baik, namun penanganan pasca panen yang kurang optimal masih sering terjadi di Indonesia. Hal ini menyebabkan penurunan kualitas biji kakao. Salah satu metode yang bermanfaat untuk meningkatkan kualitas biji kakao adalah dengan melakukan fermentasi biji kakao (Meryandini *et al.*, 2019).

Proses fermentasi biji kakao dimulai ketika biji kakao sudah dikeluarkan dari dalam buah kakao. Mikroorganisme yang berasal dari luar akan bertumbuh di pulp yang mengelilingi biji kakao sehingga terjadi proses fermentasi. Lendir (*pulp*) mengandung glukosa, fruktosa, dan asam sitrat yang akan difermentasikan menjadi asam laktat dan etanol. Perubahan kandungan substrat menjadi etanol menyebabkan adanya pertumbuhan bakteri asam asetat yang mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat (Papalexandratou *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian Moreira *et al.* (2013), terdapat 3 spesies bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat pada biji kakao, yaitu *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* dan *Lactobacillus rhamnosus*. Spesies *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus casei* yang paling umum dijumpai pada biji kakao. *Lactobacillus plantarum* diketahui banyak diisolasi dari fermentasi biji kakao dan memiliki potensi sebagai agen probiotik (Foong *et al.*, 2013). Keberadaan BAL dalam proses fermentasi memiliki tiga peran penting, yaitu memfermentasi glukosa dan fruktosa menjadi asam

laktat, menggunakan asam sitrat didalam pulp untuk memproduksi asam laktat, asam asetat, asetaldehida, diasetil, asetoin dan 2,3- butanediol, dan dapat mengubah fruktosa menjadi manitol (Ho *et al.*, 2015). Bakteri asam laktat menghasilkan aktivitas antimikroba yang kuat melawan mikroba termasuk organisme pembusuk makanan dan patogen dengan memproduksi berbagai senyawa seperti asam organik, *diacetyl*, hidrogen peroksida dan bakteriosin. Mikrobia ini dianggap sebagai mikroba '*food grade*', karena sifat probiotiknya dan umumnya dikenal *Generally recognized as safe* (GRAS) sehingga digunakan luas dalam industri makanan dan nutrisi manusia. Manfaat kesehatan dari BAL adalah usus dan sistem kekebalan tubuh, serta anti-karsinogenik, anti-diare dan efek hipokolesterolemia, meningkatkan pemanfaatan laktosa (Syukur, 2013).

Berdasarkan latar belakang tersebut, diketahui bahwa keberadaan BAL memberikan kontribusi pada aroma dan tekstur dari makanan fermentasi dan juga menghambat pertumbuhan mikrobia yang tidak diinginkan. Upaya penemuan kandidat probiotik yang memiliki potensi antibakteri penting untuk diteliti. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan BAL yang berperan sebagai probiotik dan penghasil antibakteri dari biji kakao terfermentasi yang berasal dari petani biji kakao di daerah Patuk, Gunung Kidul, Yogyakarta.

## **1.2.Perumusan Masalah**

Bakteri asam laktat merupakan salah satu bakteri probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan manusia. Oleh karenanya BAL dapat ditemukan pada fermentasi biji kakao.

## **1.3.Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis BAL yang terdapat pada fermentasi kakao dan mengetahui potensinya sebagai kandidat probiotik.

## **1.4.Manfaat**



Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah mendapatkan isolat BAL yang dapat dijadikan sebagai kultur probiotik yang memiliki daya hambat kuat dalam melawan bakteri patogen. Hasil penelitian ini dapat dijadikan sumber informasi bagi masyarakat mengenai potensi bakteri asam laktat pada fermentasi kakao.

©UKDWN

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Hasil isolasi BAL dari 3 sampel biji kakao diperoleh 22 isolat BAL, empat isolat diantaranya memiliki potensi sebagai probiotik berdasarkan ketahanan pada kondisi asam, garam empedu, dan aktivitas antimikrobia terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhi* NCTC 786 dan *S. typhi* BPE 122.4CCA. Tiga diantara empat isolat tersebut, yaitu isolat S1B1, S2T2 dan S3B4 teridentifikasi sebagai *Lactobacillus plantarum* 1 (99,9%) dan memiliki potensi sebagai kandidat probiotik dengan daya hambat sedang melawan *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhi* NCTC 786 dan *S. typhi* BPE 122.4 CCA.

#### 5.2. Saran

Hasil isolat yang tidak diidentifikasi menggunakan uji API 50 CHL diteliti untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kualitas biji kakao. Isolat BAL yang berpotensi sebagai probiotik di teliti lebih lanjut dengan menyandingkan BAL dengan bakteri patogen yang berbahaya pada bahan pangan untuk mengetahui kualitas dari bakteri probiotiknya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adawiyah, S. R., Hafsan, Nur, F., & Mustami, M. H. (2015). Ketahanan Bakteri Asam Laktat Asal Dangke Terhadap Garam Empedu Sebagai Kandidat Probiotik. *Prosiding Seminar Nasional Mikrobiologi Kesehatan Dan Lingkungan*, 164–173.
- Alsaid, M., Daud, H., Bejo, S. K., & Abuseliana, A. (2010). Antimicrobial Activities of Some Culinary Spice Extracts against *Streptococcus agalactiae* and Its Prophylactic Uses to Prevent Streptococcal Infection in Red Hybrid Tilapia (*Oreochromis sp.*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6), 532–538.
- Amaliah, Z. Z. N., Bahri, S., & Amelia, P. (2018). Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Cair Rendaman Kacang Kedelai. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 5(1), 253–257. <https://doi.org/10.33096/jffi.v5i1.320>
- Amarantini, C., Satwika, D., Budiarmo, T. Y., Yunita, E. R., & Laheba, E. A. (2019). Screening of antimicrobial-producing lactic acid bacteria isolated from traditional fish fermentation against pathogenic bacteria. *Journal of Physics: Conference Series*, 1397(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1397/1/012045>
- Anja Meryandini, Asrianti Basri, T. C. S. (2019). *PENINGKATAN KUALITAS BIJI KAKAO (Theobroma cacao L) MELALUI FERMENTASI MENGGUNAKAN Lactobacillus sp. dan Pichia kudriavzevii*. 6(September 2018), 11–19.
- Ayertey, E., Zakpaa, H. D., & Ndubueze, B. O. (2017). Screening, isolation and characterization of lactic acid bacteria strains in fermenting cocoa heaps from the Eastern Region of Ghana. *Scientect Journal of Life Sciences*, 1(1), 1–7. <http://www.scientect.com/journals/index.php/SJLS>
- Bennani, S., Mchiouer, K., Rokni, Y., & Meziane, M. (2017). Characterisation and Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Moroccan Raw Cow's Milk. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(S), 4934–4944.
- Bell, C., P. Neaves, A.P. Williams. 2005. *Food Microbiology : Laboratory Practice*, Blackwell Publishing, USA
- Bhattacharjee, R., & Akoroda, M. (2018). *Taxonomy and classification of cacao*. *October*, 3–18. <https://doi.org/10.19103/as.2017.0021.01>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016). The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>

- Delshad, A., Seyed Mostafa, H., Batoul, K., Alireza, M., & Mohammad Reza, A. (2018). Identification of Lactobacillus Species Isolated From Traditional Dairy Products Using Rapd-Pcr. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 5(2), 7–13. <https://doi.org/10.15171/ajcmi.2018.02>
- Fahrurrozi, Rahayu, E. P., Nugroho, I. B., & Lisdiyanti, P. (2019). Lactic acid bacteria (LAB) isolated from fermented cocoa beans prevent the growth of model food-contaminating bacteria. *AIP Conference Proceedings*, 2099(April). <https://doi.org/10.1063/1.5098410>
- Fitriyana, N. I., Suwasono, S., & Kusnadi, J. (2016). Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenus Dari Fermentasi Alami Biji Kakao Sebagai Kandidat Agen Antikapang. *Agrointek*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.21107/agrointek.v9i1.2122>
- Foong, Y. J., Lee, S. T., Ramli, N., Tan, Y. N., & Ayob, M. K. (2013). Incorporation of potential probiotic lactobacillus plantarum isolated from fermented cocoa beans into dark chocolate: Bacterial viability and physicochemical properties analysis. *Journal of Food Quality*, 36(3), 164–171. <https://doi.org/10.1111/jfq.12028>
- Harley JP. 2005. Laboratory Exercises in Microbiology, Sixth Edition. New York: The McGraw-Hill Companies, Inc
- Harzallah, D., & Belhadj, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. <https://doi.org/10.5772/50732>
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2015). The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 205, 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.031>
- Mezaini, A., Chihib, N. E., Dilmi Bouras, A., Nedjar-Arroume, N., & Hornez, J. P. (2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. *Journal of Environmental and Public Health*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/678495>
- Moreira, I. M. da V., Miguel, M. G. da C. P., Duarte, W. F., Dias, D. R., & Schwan, R. F. (2013). Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids. *Food Research International*, 54(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.001>
- Nuraida, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional

- Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., de Bruyne, K., Vandamme, P., & de Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28(7), 1326–1338. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.003>
- Pessoa, W. F. B., Melgaço, A. C. C., De Almeida, M. E., Ramos, L. P., Rezende, R. P., & Romano, C. C. (2017). In Vitro Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3264194>
- Purwanto, E. H., Setyabudi, S., & Supriyanto, S. (2019). Aktivitas Mikrob dalam Pulp Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) Selama Fermentasi dengan Penambahan Ragi Tape. *Jurnal Tanaman Industri Dan Penyegar*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.21082/jtidp.v6n1.2019.p21-32>
- Romadhon, Subagiyo, Sebastian M. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin Sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan* Vol. 8.No. 1 .
- Santos, R. X., Oliveira, D. A., Sodré, G. A., Gosmann, G., Brendel, M., & Pungartnik, C. (2014). Antimicrobial activity of fermented theobroma cacao pod husk extract. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 7725–7735. <https://doi.org/10.4238/2014.September.26.10>
- Sari, M., Suryanto, D., & Yurnaliza. (2018). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from bekasam against staphylococcus aureus ATCC 25923, escherichia coli ATCC 25922, and salmonella sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 130(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/130/1/012011>
- Schwan, R. F., & Wheals, A. E. (2004). The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 205–221. <https://doi.org/10.1080/10408690490464104>
- Setya Utama, C., & Hanim, C. (2018). Catatan Penelitian Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria Cellulolitik Originated from Fermented Cabbage Juice. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 7(1), 2018. <https://doi.org/10.17728/jatp.2155>
- Shewale, R. N., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., & Singh, A. (2014). Selection criteria for probiotics: A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 9(1–

2), 17–22.

- Siddiqi, R., Erum, H., & Zia, M. (2018). *Exploration of probiotic potential of indigenous lactic acid bacteria*. June.
- Sulmiyati, Said, N. S., Fahrodi, D. U., Malaka, R., & Maruddin, F. (2018). The characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian commercial kefir grain. *Malaysian Journal of Microbiology*, 14(7), 632–639. <https://doi.org/10.21161/mjm.117317>
- Syukur, S. (2013). Antimicrobial Properties and Lactase Activities from Selected Probiotic *Lactobacillus brevis* Associated With Green Cacao Fermentation in West Sumatra, Indonesia. *Journal of Probiotics & Health*, 01(04), 4–7. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000113>
- Ummiyati, Siti, Okatvia ,B., & Pramiadi D.2009. Pengaruh Garam Empedu Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Asam laktat *Streptococcus sp* dari *cyme* usus halus ayam broiler Strain Lohman
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28(5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>