

4. PEMBAHASAN

Kombucha merupakan minuman yang memiliki nilai fungsional yang tinggi karena bersifat menurunkan tekanan darah bagi penderita hipertensi, meningkatkan daya tahan tubuh, memperbaiki komposisi mikroflora usus, antioksidan dan antibakteri. Kombucha mengandung komposisi nutrisi seperti asam organik, mineral, enzim, dan vitamin (Wistiana & Zubaidah, 2015). Kombucha dibuat dengan menginokulasikan *tea fungus* pada larutan teh manis kemudian difermentasi selama 10-14 hari (Jayabalan *et al*, 2014).

Pada penelitian ini dibuat kombucha dengan bahan baku teh putih. Teh putih sendiri belum terlalu dikenal oleh masyarakat Indonesia, antara lain karena harganya yang relatif lebih tinggi dari jenis teh lainnya. Namun keuntungan dari kombucha sendiri selain memiliki manfaat kesehatan yang tinggi, untuk membuat kombucha hanya diperlukan bahan baku teh dengan jumlah yang sedikit yaitu 5g/L dan 10% gula. Menurut penelitian sebelumnya kadar gula terbaik yang ditambahkan pada fermentasi kombucha adalah 10% (b/v) karena dapat memproduksi asam asetat yang tertinggi. Hal ini disebabkan jumlah enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme sebanding dengan jumlah substrat yang dibutuhkan sehingga laju pembentukan asam asetat menjadi optimal.

Pada penelitian ini ditambahkan kultur murni *Lactobacillus pentosus* A22, untuk memperkuat fungsi probiotik dalam kombucha dan manfaat kesehatan lainnya. Menurut penelitian sebelumnya diketahui bahwa *Lactobacillus* merupakan salah satu bakteri yang bersifat probiotik yang mampu bertahan pada pH rendah, garam empedu, dan menghasilkan asam-asam organik yang dapat menurunkan kolesterol (Yulinery, Yulianto, & Nurhidayat, 2006).

4.1. Mikroorganisme yang Berperan Selama Fermentasi

a. Yeast

Pengamatan *yeast* pada kultur komersial kombucha dengan pewarnaan sederhana memperlihatkan *yeast* dengan bentuk bulat mengacu pada Tabel 2. Hanya ditemukan satu jenis *yeast* pada kultur komersial kombucha dilihat dari morfologinya dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x100. Sedangkan menurut teori khamir yang terdapat dalam *tea fungus* antara lain *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospira*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula*, dan *Mycoderma*(Jayabalan *et al*, 2014). hal ini dapat disebabkan karena kultur kombucha disetiap negara memiliki komposisi mikroorganisme yang berbeda.

b. Bakteri Asam Laktat

Kultur murni bakteri *Lactobacillus pentosus* ditumbuhkan dalam media MRS A yang telah ditambahkan CaCO_3 , begitu pula dengan kultur komersial kombucha yang dipakai. Pada media akan terbentuk koloni tunggal dari bakteri asam laktat yang pada sekitar koloni terbentuk zona bening. Zona bening merupakan salah satu ciri khas dari koloni bakteri asam laktat (Rinto & Kusumawati, 2012). Zona bening terbentuk akibat reaksi antara CaCO_3 yang ditambahkan pada media MRS A, namun tidak dapat larut didalamnya, lalu bereaksi dengan asam laktat membentuk senyawa Ca-Laktat. Ca-laktat bersifat larut pada media sehingga membentuk zona bening (Sharah, Karnila, & Desmelati, 2015).

Pada masing – masing koloni tunggal yang terbentuk dan memiliki zona bening dilakukan pewarnaan gram jika dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 akan terlihat bakteri berwarna ungu. Bakteri asam laktat tergolong pada bakteri gram positif yang berbentuk bulat atau batang (Rustan, 2013). Bakteri gram positif akan membentuk warna ungu karena bakteri gram positif memiliki lapisan dinding peptidoglikan lebih tebal dari bakteri gram negatif sehingga dapat

mengikat kristal violet yang digunakan sebagai pewarna (sari) bakteri gram positif akan tetap mengikat kristal violet meskipun telah dicuci menggunakan alkohol (Sharah, Karnila, & Desmelati, 2015).

Pada hasil pengamatan dibawah mikroskop ditemukan 2 bentuk bakteri asam laktat mengacu pada Tabel 2. Pada kultur murni bakteri *Lactobacillus pentosus* dan kultur komersial kombucha sama – sama ditemukan 2 bentuk bakteri yaitu berbentuk bulat atau *coccus* dan batang atau basil. Seharusnya *Lactobacillus pentosus* memiliki bentuk batang dengan panjang 1-1.2pm atau 2-5pm dengan ujung bulat, dapat ditemukan berkoloni atau tunggal, bersifat anaerobik fakultatif. Fakultatif heterofermentative dengan memproduksi D- dan asam L-laktat (Zanoni *et al*, 1987). Kultur *Lactobacillus pentosus* yang dipakai kemungkinan belum terisolasi dengan baik sehingga masih terdapat spesies lain dalam kultur. Menurut penelitian sebelumnya ditemukan sebesar 30% bakteri asam laktat dalam populasi mikroba dalam kombucha (Nguyen *et al*, 2015). Jadi pada kultur kombucha komersial sudah terdapat bakteri asam laktat yang diduga mirip dengan bakteri asam laktat *Lactobacillus pentosus*.

c. Bakteri Asam Asetat

Kultur kombucha terdiri dari berbagai jenis bakteri, yang terbesar adalah jenis bakteri asam asetat (Jayabalan *et al*, 2014). Untuk membuktikan keberadaan bakteri asam asetat maka kultur komersial kombucha yang dipakai ditumbuhkan pada media selektif untuk bakteri asam asetat. Pada hasil pengamatan pada media PGY yang telah ditambahkan indikator metil red blue yang akan berubah warna dari hijau menjadi ungu jika terkena asam, terbentuk koloni berwarna kuning kehijauan pada media padat. Setelah dilakukan perwarnaan gram ditemukan bakteri dengan warna ungu. Bakteri yang memberikan warna ungu setelah dilakukan pewarnaan gram termasuk pada bakteri gram negatif. Warna ungu pada bakteri diakibatkan karena bakteri menyerap pewarna kedua sedangkan melepaskan pewarna pertama setelah dicuci. Bakteri menyerap pewarna kedua dan melepaskan pewarna pertama menandakan bahwa jenis bakteri ini memiliki

lapisan lipid pada dinding sel yang tebal dan lapisan peptidoglikan yang tipis. Pada saat pewarnaan lapisan lipid terlarut dalam alkohol, sehingga pori-pori sel membesar dan melarutkan kristal violet pada dinding sel (Hidayat & Fatri, 2012).

Pada hasil pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 100, mengacu pada Tabel 2, hanya terdapat 1 jenis bakteri dilihat dari bentuk bakteri yaitu berbentuk bulat. Hal ini sesuai dengan teori yang mengungkapkan bahwa bakteri asam asetat merupakan bakteri gram negatif aerobik obligat, mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. Bakteri asam asetat dibagi menjadi 2 kelompok besar yaitu acetobacter dan Gluconobakter. Bakteri acetobakter membentuk koloni berwarna kekuningan atau biru cerah pada media PGY agar yang diberi indikator bromocresol purple. Pada pewarnaan gram bakteri asam asetat memberikan warna ungu dengan bentuk bulat (Diba, Alam, & Talukder, 2015). Jadi pada kultur kombucha yang digunakan terbukti terdapat bakteri asam asetat yang memiliki bentuk bulat dan dapat menghasilkan selulosa, dibuktikan pada akhir fermentasi terbentuk selulosa diatas selulosa induk.

Pada hasil pengujian mikrobiologi pada kultur komersial kombucha dengan pewarnaan sederhana untuk yeast, pewarnaan gram untuk bakteri ditemukan yeast berbentuk lonjong pada hasil pewarnaan sederhana, dan hanya ditemukan satu jenis yeast pada kultur komersial kombucha yang digunakan pada penelitian ini. Sedangkan pada pewarnaan gram ditemukan 2 kelompok bakteri yaitu bakteri gram positif yang diduga sebagai bakteri asam laktat selain pada pewarnaan gram yang menghasilkan warna ungu, koloni yang terbentuk pada media MRS agar yang ditambahkan dengan 1% CaCO_3 terbentuk zona bening yang menandakan bakteri tersebut menghasilkan asam.

Kelompok bakteri yang kedua yaitu bakteri gram negatif yang diduga sebagai bakteri asam asetat, selain itu saat ditumbuhkan pada media selektif untuk bakteri asam laktat koloni yang terbentuk membentuk warna ungu mengacu pada Tabel 2. Pada bakteri gram negatif yang ditemukan pada kultur kombucha yang digunakan nampak 2 jenis bakteri gram negatif dilihat dari bentuknya secara mikroskopis

yaitu bentuk *coccus* dan basil. Sedangkan untuk bakteri gram positif hanya ditemukan 1 jenis saja dilihat dari bentuknya secara mikroskopis. Jadi dapat disimpulkan bahwa pada kultur kombucha yang digunakan terdapat 3kelompok besar mikroorganisme yang berperan selama fermentasi. Hal ini sesuai dengan teori bahwa *tea fungus* bukanlah sejenis jamur tetapi merupakan selulosa yang terbentuk dari simbiosis bakteri dan khamir atau *scoby* (*symbiotic culture of bacteria and yeast*)(Liu *et al.*,1996 dalam Jayabalan, Radomir, Eva, Jasmina, & Muthuswamy, 2014).

Bakteri yang terbesar yang berada dalam *tea fungus* adalah jenis bakteri asam asetat diantaranya *A. xylium*, *A. pasteurianus*, *A.aceti*, dan *Gluconobacter oxydans* (Liu *et al.*,1996 dalam Jayabalan, Radomir, Eva, Jasmina, & Muthuswamy, 2014). Sedangkan khamir yang terdapat dalam *tea fungus* antara lain *Saccharomyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Koleckera*, *Pichia*, *Mycotorula*, dan *Mycoderma*(Jayabalan *et al*, 2014).

4.2. Perubahan Kepadatan Sel Selama Proses Fermentasi

Hasil pengujian kepadatan sel dengan metode spektrofotometri mengukur absorbansi atau OD (*optical density*) dari sel mikroba dimana nilai OD akan berbanding lurus dengan jumlah sel dalam larutan yang diukur. Semakin tinggi OD maka semakin banyak jumlah sel dalam larutan. Pada hasil penelitian mengacu pada Tabel 3, didapatkan peningkatan OD selama 14 hari proses fermentasi berlangsung yang artinya terjadi peningkatan jumlah sel selama proses fermentasi. Pada ketiga perlakuan peningkatan OD mengikuti fungsi logaritma mengacu pada Gambar 2 yang menunjukkan kenaikan OD yang konstan yang menandakan kenaikan jumlah sel yang konstan. Perlakuan fruktosa memiliki grafik kenaikan OD yang paling tajam ditinjau dari gambar 2.

Pada pengujian mikrobiologi ditemukan bahwa ada 3 jenis mikroorganisme yang bekerja dalam fermentasi kombucha. Ketiga mikroorganisme dalam kombucha

bersimbiosis yang saling mendukung pertumbuhan satu jenis dengan jenis yang lain. *Yeast* bekerja pertama mengubah gula menjadi alkohol dan senyawa – senyawa lain yang menstimulasi peningkatan pertumbuhan bakteri asam asetat. Kemudian bakteri asam asetat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat (Aditiawat & Kusnadi, 2003).

Laju perubahan nilai OD dilihat dengan menurunkan fungsi logaritma, laju perubahan OD selama proses fermentasi menurun tajam dari hari ke 2 hingga hari ke 4 kemudian menurun secara perlahan hingga hari ke 14 ditinjau dari gambar 3. Pada perlakuan fruktosa menunjukkan grafik penurunan yang paling curam dibandingkan dengan perlakuan sukrosa dan glukosa. Penurunan laju perubahan absorbansi atau OD disebabkan mikroba pada kombucha akan memanfaatkan nutrisi pada larutan teh seperti gula asam – asam amino, dan kafein Zat sebagai sumber nutrisi yang menunjang pertumbuhan mikroba meningkat. Akan tetapi semakin lama fermentasi pertumbuhan mikroba akan terhambat dan menurun akibat kandungan senyawa fenol yang bersifat antimikroba yang terbentuk selama fermentasi (Wistiana & Zubaidah, 2015).

Pada penurunan kedua fungsi logaritma didapatkan percepatan perubahan kepadatan sel. Percepatan perubahan kepadatan sel mengalami penurunan tajam dari hari ke 2 hingga hari ke 4 kemudian mengalami penurunan secara perlahan hingga hari ke 14. Penurunan laju perubahan kepadatan sel diduga diakibatkan oleh senyawa – senyawa yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang menghambat perkembangbiakan mikroorganisme itu sendiri. Semakin lama fermentasi pertumbuhan mikroba akan terhambat dan menurun akibat kandungan senyawa fenol yang bersifat antimikroba yang terbentuk selama fermentasi (Wistiana & Zubaidah, 2015).

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa terdapat interaksi antara bakteri asam laktat dengan bakteri asam asetat dalam kombucha yang dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Bakteri asam laktat meningkatkan ketahanan hidup bakteri asam asetat dan meningkatkan produksi D-saccharic acid

1,4 lactone. Sedangkan bakteri asam asetat mensekresi vitamin b yang mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat (Nguyen *et al*, 2014).

Pada hasil kepadatan sel didapatkan bahwa fruktosa memiliki hasil grafik peningkatan kepadatan sel yang paling tajam begitu pula pada laju dan percepatan perubahannya. Hal ini diduga dipengaruhi oleh *yeast* yang berada pada kultur kombucha. *Yeast* yang bekerja memiliki keragaman kemampuan menggunakan gula jenis tertentu. Beberapa jenis yeast memiliki kemampuan menggunakan fruktosa lebih baik dari pada glukosa. Kelompok *S. cerevisiae* secara umum memiliki sifat glucophilic, sedangkan kelompok yeast lain seperti *Candida stellata* dan *Zygosaccharomyces bailii* memiliki kemampuan penggunaan fruktosa yang lebih baik (Berthels *et al*, 2014). Maka *yeast* pada kultur kombucha yang digunakan pada penelitian ini diduga memiliki kemampuan yang baik dalam menggunakan fruktosa dibandingkan jenis gula yang lain. Ketika *yeast* menggunakan fruktosa menjadi nutrisi maka akan meningkatkan pertumbuhan *yeast* itu sendiri dan meningkatkan produksi alkohol yang mendukung pertumbuhan bakteri asam asetat. Sehingga pada perlakuan fruktosa memiliki kepadatan sel yang paling tinggi.

Jika dihubungkan antara kepadatan sel dengan pengujian pH, dimana peningkatan kepadatan sel secara signifikan hingga hari ke 4 diikuti oleh penurunan pH secara signifikan hingga hari ke 4. Kedua variabel ini saling berhubungan karena nilai pH yang rendah selama fermentasi memberikan kondisi optimal yang mendukung pertumbuhan bakteri *Acetobacter* dalam kultur kombucha untuk melangsungkan aktivitas metabolismenya. Aktivitas bakteri *Acetobacter* menghasilkan asam asetat yang terlarut dan terdisosiasi untuk melepaskan proton-proton bebas sehingga menurunkan pH larutan. Sehingga selama fermentasi berlangsung nilai pH terus menurun (Wistiana & Zubaidah, 2015). Selain itu pH rendah juga diakibatkan terbentuknya asam organik dari bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat meningkatkan ketahanan hidup bakteri asam asetat dan meningkatkan produksi D-saccharic acid 1,4 lactone. Sedangkan bakteri asam asetat mensekresi

vitamin b yang mendukung pertumbuhan bakteri asam laktat (Nguyen *et al*, 2014).

4.3. Pertumbuhan BAL selama Proses Fermentasi

Pada hasil pengujian total bakteri asam laktat mengacu pada gambar 5, didapatkan pada ketiga perlakuan memiliki pola kurva yang sama, yaitu bakteri asam laktat mengalami peningkatan hingga hari ke 12 kemudian menurun pada hari ke 14. Nutrisi yang terdapat pada teh terutama kandungan gula dimanfaatkan oleh bakteri asam laktat sehingga pertumbuhan bakteri dapat meningkat, namun selama perombakan gula oleh bakteri asam laktat dihasilkan asam – asam organik yang akan menghambat pertumbuhan bakteri pada titik tertentu. Selain itu mikroorganisme lain dalam kombucha juga menghasilkan metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri asam laktat seperti, alkohol dan asam organik yang dihasilkan bakteri asam asetat (Wistiana & Zubaidah, 2015).

Pada data dilakukan pendekatan dengan cara interpolasi dimana mencari suatu fungsi dari data yang telah diketahui (Cahyono, 2013) pada penelitian ini dilakukan interpolasi polinomial dimana data yang didapatkan dilakukan pendekatan dengan fungsi polinomial. Sehingga didapatkan data dapat lebih mudah diamati dan diinterpretasikan. Pendekatan dilanjutkan dengan menurunkan fungsi agar diketahui kecepatan perubahan, fungsi turunan yang didapatkan disesut *first derivative* (dy/dx) (Newby, 1980).

Pada hasil pengujian total bakteri asam laktat mengikuti pola fungsi polinomial pangkat 3 yang ketika diturunkan menjadi fungsi polinomial pangkat 2 akan didapatkan laju perubahan total bakteri asam laktat. Ditinjau dari gambar 6, laju total bakteri asam laktat mengalami peningkatan hingga hari ke 6 kemudian menurun tajam hingga hari ke 14. Pada perlakuan sukrosa didapatkan grafik peningkatan laju perubahan total BAL paling tajam, diikuti perlakuan glukosa. Perlakuan fruktosa memiliki grafik penurunan yang paling landai. Peningkatan laju diakibatkan penggunaan nutrisi seperti gula dalam media untuk pertumbuhan

bakteri. Penurunan laju diduga diakibatkan dihasilkannya senyawa metabolit oleh BAL (Wistiana & Zubaidah, 2015).

Pendekatan dilanjutkan dengan menurunkan fungsi polinomial pangkat 2 menjadi fungsi linier, sehingga dapat diketahui percepatan perubahan total bakteri asam laktat. Penurunan kedua kali akan didapatkan fungsi linier yang sering disebut *second derivative* atau *derivative of order two of y* (d^2y/dx^2). Pada kurva ini juga dapat diketahui titik kritis yaitu ketika $f'(x)=0$ dimana terjadi perubahan yang signifikan, atau bahkan titik balik (Newby, 1980). Mengacu pada gambar 7, percepatan perubahan bakteri asam laktat mengalami penurunan hingga hari ke 14. Penurunan percepatan diduga diakibatkan terhambatnya pertumbuhan bakteri oleh penghambatan senyawa metabolit oleh BAL (Wistiana & Zubaidah, 2015).

Mengacu pada gambar 7 juga dapat dilihat tercapainya titik kritis dimana grafik menyentuh sumbu x. titik kritis menunjukkan titik dimana terjadi perubahan secara signifikan. Pada grafik perlakuan glukosa dan fruktosa menyentuh sumbu x secara bersamaan setelah itu diikuti perlakuan sukrosa. Kemudian dilakukan analisa grafik model matematika dengan mencari nilai x ketika $y=0$, nilai x menunjukkan waktu tercapainya titik kritis. Kemudian mengintegrasikan fungsi dari hasil total bakteri asam laktat yaitu fungsi polinomial pangkat 3 menjadi pangkat 4. Ketika nilai x dimasukkan akan ditemukan nilai y yang menunjukkan nilai akumulasi total bakteri asam laktat hingga tercapai titik kritis (Newby, 1980).

Mengacu pada tabel 5 diketahui fruktosa memiliki waktu paling cepat mencapai titik kritis, diikuti perlakuan glukosa dan yang terakhir perlakuan sukrosa. Pada akumulasi total BAL hingga tercapainya titik kritis justru perlakuan sukrosa yang memiliki akumulasi terbesar, diikuti perlakuan glukosa dan yang terakhir perlakuan fruktosa. Pada teori diketahui bakteri asam laktat dapat menggunakan gula jenis glukosa lebih baik dari pada menggunakan gula jenis fruktosa dan sukrosa, sehingga pada perlakuan glukosa total bakteri asam laktat memiliki nilai tertinggi. Menurut penelitian sebelumnya bakteri asam laktat menggunakan glukosa lebih cepat dari pada menggunakan fruktosa sebagai energi (Erten, 2000).

Namun pada fermentasi ini melibatkan 3 jenis mikroorganisme, dimana pada fase awal yeast berperan dominan, sedangkan diduga yeast dalam penelitian ini menggunakan fruktosa lebih baik untuk menciptakan suasana yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri asam laktat dibandingkan dengan jenis gula lainnya. Maka dari itu perlakuan fruktosa memberikan waktu terbaik, diikuti perlakuan glukosa dan perlakuan sukrosa.

4.4. Perubahan pH selama Fermentasi

Hasil penelitian mengacu pada Tabel 6 menunjukkan pada masing – masing perlakuan jenis gula menunjukkan penurunan pH seiring lamanya waktu fermentasi. Pada ketiga perlakuan penurunan pH dilakukan pendekatan menggunakan model matematika dengan fungsi logaritmik. Pada ketiga perlakuan terjadi penurunan pH selama proses fermentasi, namun penurunan pH ketiga perlakuan hampir sama mengacu pada gambar 8. Terjadi penurunan pH selama proses fermentasi akibat selama proses fermentasi mikroorganisme dalam kombucha menghasilkan asam – asam organik yang meningkat seiring lamanya proses fermentasi, yang mengakibatkan penurunan pH (Jayabalan *et al*, 2014).

Seperti yang telah dianalisa sebelumnya pada kultur kombucha terdapat 3 jenis mikroorganisme yang bekerja selama fermentasi yaitu khamir, bakteri asam laktat, dan bakteri asam asetat. Yeast menghidrolisa sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dengan menggunakan enzim invertase dan menghasilkan etanol pada jalur glikolisis. Bakteri asam asetat pada kombucha menggunakan glukosa, asam glukoronat dan etanol untuk memproduksi asam asetat (Jayabalan *et al*, 2014). Selain asam laktat bakteri asam laktat juga bersimbiosis dengan bakteri asam asetat untuk menghasilkan asam glukoronat dan *D-saccharic acid 1,4 lactone* (DSL)(Nguyen *et al*, 2014). Bakteri Acetobacter mengoksidasi glukosa yang dihasilkan oleh yeast menjadi asam glukonat dan asam organik lain. Selain itu Acetobacter mensintesis glukosa menjadi polisakarida atau selulosa berupa serat-serat putih (Aditiwat & Kusnadi, 2003).

Perbedaan penurunan pH pada ketiga perlakuan kurang dapat diamati, maka dilakukan penurunan fungsi logaritma untuk mengetahui laju penurunan pH ketiga perlakuan. Laju penurunan pH dapat dilihat dari fungsi turunan logaritma mengacu pada Gambar 9, laju penurunan pH mengalami peningkatan tajam hingga hari ke 4 kemudian meningkat secara lambat hingga hari ke 14. Pada perlakuan glukosa memiliki grafik laju penurunan pH yang lebih landai dari perlakuan sukrosa dan fruktosa.

Peningkatan laju penurunan pH diakibatkan terbentuknya metabolit berupa asam-asam organik hasil perombakan nutrisi pada media (Jayabalan *et al*, 2014). Metabolit utama yang dihasilkan selama fermentasi kombucha meliputi monosakarida, beberapa jenis asam organik, dan vitamin (Goh *et al*, 2014). Pada fermentasi kombucha dihasilkan komponen mayor antara lain asam asetat, etanol, dan asam glukuronat, dan beberapa komponen minor komponen minor antara lain asam laktat, asam fenolat, vitamin B, dan enzim (Suhardini & Zubaidah, 2016). Penurunan laju diduga akibat terciptanya sifat buffer dari karbondioksida yang berdisosiasi dan menghasilkan *amphiprotic hydrocarbon anion* (HCO_3^-). *Amphiprotic hydrocarbon anion* (HCO_3^-) bersifat mudah bereaksi dengan ion hidrogen dari asam – asam organik yang dihasilkan selama fermentasi, sehingga dapat mencegah perubahan konsentrasi H^+ dalam larutan.

Pelakuan fruktosa dan glukosa seharusnya memiliki laju perubahan pH yang sama karena berasal dari golongan monosakarida, namun hal ini berhubungan dengan kemampuan yeast dalam menggunakan glukosa dan fruktosa. Beberapa jenis yeast memiliki kemampuan menggunakan fruktosa lebih baik dari pada glukosa. Kelompok *S. cerevisiae* secara umum memiliki sifat glucophilic, sedangkan kelompok yeast lain seperti *Candida stellata* dan *Zygosaccharomyces bailii* memiliki kemampuan penggunaan fruktosa yang lebih baik (Berthels *et al*, 2014). Jika yeast mampu mengubah fruktosa lebih cepat mengakibatkan laju pembentukan alkohol yang kemudian mendukung pertumbuhan bakteri untuk mensintesis asam – asam organik. Sehingga pada fermentasi fruktosa mengalami penurunan pH yang paling baik.

Pendekatan dilanjutkan dengan menurunkan kembali fungsi logaritma sehingga didapatkan percepatan perubahan pH. Mengacu pada gambar 10, percepatan mengalami penurunan tajam hingga hari ke 4 kemudian penurunan melambat hingga hari ke 10 kemudian stabil. Penurunan percepatan perubahan pH diduga diakibatkan karbondioksida yang berdisosiasi dan menghasilkan *amphiprotic hydrocarbon anion* (HCO_3^-). *Amphiprotic hydrocarbon anion* (HCO_3^-) bersifat mudah bereaksi dengan ion hidrogen dari asam – asam organik yang dihasilkan selama fermentasi, sehingga dapat mencegah perubahan konsentrasi H^+ dalam larutan.

4.5. Perubahan Aktivitas Antioksidan selama Proses Fermentasi

Pengujian antioksidan pada kombucha dilakukan dengan menggunakan larutan DPPH sebagai radikal bebas. Hasil dari pengujian mengacu pada gambar 11, pada perlakuan sukrosa dan fruktosa aktivitas mengalami peningkatan hingga hari ke 4 kemudian menurun hingga hari ke 10 setelah itu meningkat kembali pada hari ke 14. Pada perlakuan glukosa aktivitas antioksidan mengalami peningkatan hingga hari ke 6 kemudian stabil hingga hari ke 10 setelah itu meningkat kembali pada hari ke 14.

Peningkatan aktivitas antioksidan pada kombucha bergantung pada keberadaan polifenol, asam askorbat, dan DSL. Pada hasil penelitian ini ditambahkan kultur murni *Lactobacillus pentosus*, yang juga mempengaruhi terbentuknya senyawa antioksidan. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa terdapat interaksi antara bakteri asam laktat dengan bakteri asam asetat dalam kombucha yang dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder komponen antioksidan yang terdapat dalam kombucha seperti vitamin C, vitamin B, dan DSL (Nguyen *et al*, 2014). Kombucha diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan teh tanpa fermentasi karena pada kombucha dihasilkan komponen dengan berat molekul yang rendah dan modifikasi struktur polifenol oleh enzim yang dihasilkan oleh yeast dan bakteri selama proses fermentasi

(Jayabalan *et al*, 2014). Selain merombak gula menjadi alkohol dan senyawa yang lebih sederhana yeast juga menghasilkan enzim-enzim diantaranya invertase, zimase, karboksilase, heksokinase, dehidrogenase, sedangkan bakteri asam asetat menghasilkan enzim dehidrogenase (Aditiwat & Kusnadi, 2003).

Peningkatan aktivitas antioksidan selama fermentasi juga dikarenakan terbentuknya fenolik bebas, sehingga semakin tinggi kadar fenolik yang dihasilkan, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Selain itu daun teh sendiri mengandung antioksidan flavonoid yang merupakan bagian dari polifenol yang juga berperan sebagai antioksidan (Suhardini & Zubaidah, 2016). Proses terbentuknya senyawa fenol selama proses fermentasi diduga karena adanya proses biotransformasi oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dalam kombucha. Selama proses fermentasi *yeast* dapat menghasilkan beberapa jenis enzim seperti *vinyl phenol reductase*. Enzim *ferulic acid reductase* dapat membentuk fenol akibat dekarboksilasi asam sinamat dan asam ferulat yang dihasilkan oleh bakteri penghasil asam organik. Asam sinamat sendiri merupakan senyawa fenol yang juga berperan sebagai antioksidan. Asam ferulat merupakan senyawa turunan dari golongan asam hidroksi sinamat, yang juga bersifat antioksidan (Suhardini & Zubaidah, 2016).

Peningkatan senyawa fenol selama proses fermentasi diakibatkan adanya proses dipolimerisasi tearubigin oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme dalam kombucha (Wistiana & Zubaidah, 2015). Maka semakin tinggi senyawa fenol yang terbentuk semakin tinggi aktivitas antioksidan dari kombucha. Namun menurut penelitian setelah fermentasi selama 14 hari aktivitas antioksidan mengalami penurunan dikarenakan suasananya yang terlalu asam menyebabkan senyawa fenolik menjadi semakin stabil sehingga tidak dapat lagi mendonorkan proton pada radikal bebas (Suhardini & Zubaidah, 2016).

Fungsi polinomial pangkat 3 diturunkan menjadi polinomial pangkat 2 untuk mengetahui laju perubahan aktivitas antioksidan. Mengacu pada gambar 12, laju perubahan aktivitas antioksidan pada perlakuan sukrosa dan fruktosa mengalami

penurunan curam hingga hari ke 10 kemudian mengalami peningkatan tajam hingga hari ke 14. Pada perlakuan glukosa laju perubahan mengalami penurunan hingga hari ke 12 kemudian meningkat hingga hari ke 14. Laju menurun diakibatkan nutrisi dalam media yang semakin sedikit sehingga laju pembentukan metabolit menurun. Peningkatan laju aktivitas antioksidan diduga diakibatkan karena terbentuknya senyawa fenolik bebas dari degradasi senyawa kompleks (Tapas, Sakarkar, & Kakde, 2008).

Fungsi polinomial kembali diturunkan menjadi fungsi linier sehingga diketahui percepatan perubahan aktivitas antioksidan. Mengacu pada gambar 13, percepatan perubahan aktivitas antioksidan mengalami peningkatan sampai hari ke 14. Pada gambar 13 juga dapat diamati ketiga perlakuan mencapai titik kritis dimana graik menyentuh garis x. perlakuan sukrosa dan fruktosa menyentuh sumbu x disaat yang bersamaan diikuti perlakuan glukosa. Setelah dilakukan analisa grafik model matematika diketahui perlakuan fruktosa memiliki waktu tercepat untuk mencapai titik kritis diikuti perlakuan sukrosa dan yang terakhir perlakuan glukosa. Namun jika dilihat dari akumulasi aktivitas antioksidan hingga tercapai titik kritis, glukosa memiliki akumulasi terbesar, diikuti perlakuan sukrosa dan yang terakhir fruktosa.

Aktivitas antioksidan berhubungan erat dengan senyawa senyawa fenolik dan senyawa lain yang merupakan hasil metabolit sekunder. Senyawa ini terbentuk dengan bantuan enzim yang dihasilkan oleh *yeast* dan seperti yang telah dipaparkan sebelumnya *yeast* pada kultur kombucha yang digunakan pada penelitian ini lebih baik dalam penggunaan fruktosa sehingga pada perlakuan fruktosa didapatkan hasil antioksidan yang baik karena *yeast* menghasilkan enzim yang mengubah senyawa antioksidan lebih cepat (Tapas, Sakarkar, & Kakde, 2008).

Jika dihubungkan dengan dengan kepadatan sel. Pada perlakuan sukrosa, mengacu pada gambar 11 kepadatan sel mengalami peningkatan hingga hari ke 7 dimana tercapai titik kritis pada aktivitas antioksidannya. Pada perlakuan glukosa,

kepadatan sel terus meningkat hingga hari ke 8 dimana aktivitas antioksidan mencapai titik kritis. Begitu pula pada perlakuan fruktosa kepadatan sel meningkat hingga hari ke 7 dimana tercapai titik kritis pada aktivitas antioksidannya. Hal ini menunjukkan bahwa kepadatan sel mempengaruhi aktivitas antioksidan pada kombucha. Meningkatnya kepadatan sel yang menunjukkan banyaknya jumlah mikroorganisme yang juga semakin banyak memproduksi metabolit. Metabolit yang dihasilkan diduga berperan dalam aktivitas antioksidannya.

Jika dihubungkan dengan total bakteri asam laktat. Pada perlakuan sukrosa, ditinjau dari gambar 5 bakteri asam laktat mengalami peningkatan hingga hari ke 7 dimana aktivitas antioksidannya mencapai titik kritis. Pada perlakuan glukosa bakteri asam laktat juga mengalami peningkatan hingga hari ke 8 dimana aktivitas antioksidannya mencapai titik kritis. Begitu pula pada perlakuan fruktosa, bakteri asam laktat mengalami peningkatan hingga hari ke 7 dimana aktivitas antioksidannya mencapai titik kritis. Hal ini membuktikan bahwa bakteri asam laktat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Seiring meningkatnya jumlah bakteri asam laktat maka aktivitas antioksidannya juga meningkat. Hal ini berubungan dengan asam – asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat seperti asam glukoronat dan *D-saccharic acid 1,4 lactone* (DSL) yang juga berperan dalam aktivitas antioksidan (Nguyen *et al*, 2014)

4.6. Perubahan Total Flavonoid selama Proses Fermentasi

Teh putih merupakan jenis teh yang jarang diproduksi karena memerlukan proses khusus dan hanya melibatkan bagian pucuk teh yang masih menggulung dan mengandung polifenol yang tinggi dibandingkan bagian teh yang lain. Teh putih memiliki bulu putih yang terdapat diseluruh permukaan daun yang masih menggulung yang menyebabkan warna silver ketika daun dikeringkan, namun ketika diseduh menghasilkan warna kuning pada larutan. Proses pengolahan teh putih meliputi pengukusan secara cepat kemudian dikeringkan, proses pengolahan

ini menyebabkan kandungan polifenol pada teh putih tidak berubah (Karori *et al*, 2007)

Komposisi kimia dari teh sangat kompleks termasuk kandungan polifenol, alkaloid, asam amino, karbohidrat, protein, klorofil, komponen volatil, mineral. Polifenol merupakan senyawa bioaktif utama dalam teh (Karori *et al*, 2007). Senyawa polifenol terbesar yang ada didalam tumbuhan adalah flavonoid. Flavonoid terbagi menjadi beberapa subkategori yaitu *flavonones*, *flavanones*, *flavonols*, *flavanols* dan *anthocyanins* (Davies & Yanez, 2013). Selama proses fermentasi akan terjadi perubahan komposisi dari larutan termasuk komposisi flavonoidnya yang salah satu senyawa yang berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Maka dari itu pada penelitian ini dilakukan analisa total flavonoid.

Pada pengujian total flavonoid pada kombucha selama fermentasi didapatkan data yang mengikuti kurva fungsi polinomial dapat dilihat pada Gambar 14. Pada hasil penelitian, keseluruhan perlakuan memiliki pola kurva polinomial yang berbeda, Pada perlakuan glukosa dan fruktosa total flavonoid pada kombucha mengalami penurunan hingga hari ke 6 kemudian mengalami peningkatan hingga hari ke 14 atau hingga akhir fermentasi. Perlakuan sukrosa total flavonoid pada kombucha mengalami penurunan hingga hari ke 6 lalu stabil pada hari ke 8, kemudian mengalami peningkatan hingga hari ke 14 atau hingga akhir fermentasi.

Senyawa flavonoid dan polifenol dalam kombucha termasuk metabolit sekunder karena dihasilkan senyawa fenol bebas selama fermentasi pada fase stasioner. Selain itu flavonoid terbentuk dari reaksi enzimatik (Suhardini & Zubaidah, 2016), diduga enzim yang bekerja dalam reaksi pembentukan flavonoid baru aktif pada hari ke 6 sehingga bagru terjadi kenaikan total flavonoid. Polifenol dan flavonoid pada teh mengalami peningkatan secara progresif selama proses fermentasi. Peningkatan ini dikarenakan adanya degradasi polifenol dan flavonoid kompleks pada teh menjadi molekul yang lebih sederhana oleh enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme dari genus *Candida* diketahui memiliki

kemampuan untuk mendegradasi polifenol dan flavonoid (Chakravorty *et al*, 2016).

Laju perubahan total flavonoid dilihat dari grafik turunan fungsi polinomial. Dari grafik turunan fungsi polinomial, laju perubahan membentuk kurva linier yang menandakan terjadi peningkatan laju perubahan secara konstan ditinjau dari gambar 15. Pembentukan senyawa flavonoid berhubungan dengan terbentuknya senyawa fenol. Senyawafenol dalam bahan baku dan peningkatan selama proses fermentasi mendorong bakteri dan *yeast* dalam kombucha untuk bermetabolisme menghasilkan senyawa flavonoid (Suhardini & Zubaidah, 2016). Sedangkan senyawa fenol sendiri terbentuk karena reaksi yang dibantu oleh enzim yang dihasilkan oleh *yeast*. Selama proses fermentasi *yeast* dapat menghasilkan beberapa jenis enzim seperti *vinyl phenol reductase*. Enzim *ferulic acid reductase* dapat membentuk fenol akibat dekarboksilasi asam sinamat dan asam ferulat yang dihasilkan oleh bakteri penghasil asam organik. Asam sinamat sendiri merupakan senyawa fenol yang juga berperan sebagai antioksidan. Asam ferulat merupakan senyawa turunan dari golongan asam hidroksi sinamat, yang juga bersifat antioksidan (Suhardini & Zubaidah, 2016).

Pada gambar 15 juga dapat dilihat ketiga perlakuan mencapai titik kritis dimana grafik menyentuh sumbu x. Perlakuan fruktosa menyentuh sumbu x terlebih dahulu, setelah itu perlakuan sukrosa dan glukosa menyentuh sumbu x secara bersamaan. Setelah dilakukan analisa grafik model matematika diketahui bahwa perlakuan fruktosa mencapai titik kritis tercepat, diikuti perlakuan glukosa dan yang terakhir sukrosa. Namun pada akumulasi total flavonoid perlakuan sukrosa memberikan akumulasi total flavonoid terbesar, diikuti perlakuan glukosa dan yang terakhir perlakuan fruktosa.

Pada penelitian ini *yeast* yang digunakan diduga mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam menggunakan fruktosa dibandingkan dengan jenis gula yang lain sehingga pertumbuhannya pada perlakuan fruktosa lebih cepat. Pertumbuhan *yeast* menghasilkan metabolit mayor antara lain asam asetat, etanol, dan asam

glukoronat, dan beberapa komponen minor komponen minor antara lain asam laktat, asam folat, vitamin B, dan enzim (Suhardini & Zubaidah, 2016). Enzim yang dihasilkan mempengaruhi pembentukan flavonoid, sehingga flavonoid pada perlakuan fruktosa lebih cepat terbentuk dibanding dengan perlakuan yang lain.

Jika dihubungkan dengan aktivitas antioksidan pada kombucha. Aktivitas antioksidan tergantung pada struktur dari senyawa penangkap radikal bebas, kemampuan tersebut dapat dilihat dari cincin flavonoidnya atau dari derajat polimerasinya (Jayabalan *et al*, 2014). Aktivitas antioksidan pada kombucha juga dapat dipengaruhi oleh kandungan dalam bahan bakunya, salah satunya senyawa golongan fenol yang selama proses fermentasi diubah menjadi fenolik bebas yang meningkatkan aktivitas antioksidan (Suhardini & Zubaidah, 2016). Senyawa fenolik merupakan hasil metabolit sekunder. Metabolit sekunder pada fermentasi dihasilkan pada fase stasioner, fermentasi kombucha merupakan jenis fermentasi dengan sistem batch sehingga memungkinkan terjadinya fase stasioner, maka senyawa fenolik dapat terbentuk (Tapas, Sakarkar, & Kakde, 2008). Senyawa fenol merupakan salah satu faktor terbentuknya senyawa flavonoid. Senyawa fenol dalam bahan baku dan peningkatan selama proses fermentasi mendorong bakteri dan *yeast* dalam kombucha untuk bermetabolisme menghasilkan senyawa flavonoid (Suhardini & Zubaidah, 2016).

4.7. Kemampuan Probiotik pada Kombucha di Akhir Fermentasi

Dalam menurunkan kolesterol, bakteri/probiotik *Lactobacillus* menghasilkan zat-zat anti kolesterol dan menyerap sejumlah kolesterol ke dalam selnya. Dalam pembuluh darah, asam organik yang dihasilkannya, seperti asam askorbat, asam folat, dan asam kolat dapat menyebabkan terjadinya disosiasi LDL (low density of lipoprotein), partikel penyusun kolesterol berbahaya (Triana, Yulianto, & Nurhidayat, 2006). Aktivitas antioksidan dan kemampuan detoksifikasi dari kombucha didalam hati manusia menciptakan manfaat *hepatoprotection* (Jayabalan *et al*, 2014).

Pada hasil pengujian produk akhir yaitu berupa pengujian kemampuan probiotik dari kombucha diketahui bahwa perlakuan yang menghasilkan bakteri yang memiliki ketahanan terhadap asam empedu tertinggi adalah perlakuan dengan jenis gula sukrosa mengacu pada Gambar 10. Pada perlakuan jenis gula glukosa memiliki ketahanan terhadap asam empedu dibawah perlakuan jenis gula sukrosa namun lebih baik dibandingkan fruktosa. Sedangkan perlakuan jenis gula fruktosa memiliki ketahanan asam empedu yang paling rendah namun jumlah bakteri asam laktat yang bisa bertahan masih diatas 3×10^6 yaitu sebesar 4.22×10^7 CFU/ml.

Pada pengujian ketahanan terhadap pH rendah, pada perlakuan sukrosa bakteri asam laktat justru dapat bertahan pada pH 2,5, sedangkan pada pH 3 dan 2 bakteri yang bisa bertahan lebih rendah yaitu sebesar 5×10^7 . Pada perlakuan jenis gula fruktosa dihasilkan bakteri yang memiliki ketahanan yang stabil pada pH 2.5-3 tetapi sedikit menurun pada pH 2. Secara keseluruhan jumlah bakteri asam laktat yang bertahan masih diatas 3×10^6 sehingga masih memenuhi syarat. Bakteri asam laktat memiliki fungsi sebagai bakteri probiotik. Salah satu bakteri asam laktat yang umum digunakan sebagai probiotik saluran pencernaan adalah *Lactobacillus*. Bakteri probiotik merupakan bakteri yang memberikan manfaat kesehatan jika dikonsumsi karena bakteri tersebut tidak bersifat patogen justru menghasilkan senyawa yang bermanfaat bagi kesehatan. Bakteri probiotik menghasilkan asam laktat, H_2O_2 , bakteriosin yang bersifat antimikroba dan berbagai enzim diantaranya laktase yang dapat mengatasi intoleransi terhadap laktosa, dan bile salt hydrolase yang berfungsi menurunkan kolesterol. Bakteri probiotik juga memiliki aktivitas antikarsinogenik dan stimulasi sistem imunitas (Triana, Yulianto, & Nurhidayat, 2006).

Bakteri asam laktat dapat bertahan pada pH 2-3 disebabkan karena sel bakteri asam laktat memiliki kemampuan untuk mempertahankan pH didalam selnya, sehingga pH dalam sel bakteri menjadi lebih netral dibandingkan dengan pH lingkungan. Selain itu bakteri asam laktat lebih bisa bertahan pada lingkungan asam. Adanya perbedaan jumlah bakteri yang bertahan dapat disebabkan perbedaan ketahanan membran sel bakteri terhadap penurunan pH ekstraseluler. Bakteri asam laktat

memang dadat mempertahankan pH sitoplasma dalam sel menjadi lebih alkali dibandingkan pH ekstraseluler, akan tetapi penurunan pH intraseluler tetap terjadi yang mempengaruhi kemampuan keragaman ketahanan terhadap pH ekstraseluler (Halim & Zubaidah, 2013). pH internal bakteri dapat menurun akibat enzim yang terikat pada membran sel melakukan reaksi reversible dengan bertindak sebagai pompa yang memindahkan proton menyebrangi membran sel akibat hidrolisis atau sintesis ATP (Halim & Zubaidah, 2013).

Bakteri asam laktat dapat bertahan pada garam empedu tergantung pada derajat tahan terhadap garam empedu. Bakteri asam laktat harus memiliki ketahanan terhadap garam empedu agar dapat memnerikan fungsi yang maksimal dalam saluran pencernaan, terutama saluran usus bagian atas tempat empedu disekresikan. Empedu memiliki peran sebagai senyawa aktif permukaan sehingga enzim lipolitik yang disekresikan pankreas menjadi aktif. Enzim lipolitik jika bereaksi dengan asam lemak pada membran sitoplasma bakteri mengakibatkan perubahan struktur membran dan sifat permeabilitas dari bakteri. Struktur asam lemak pada membran sitoplasma bakteri mempengaruhi ketahannya terhadap garam empedu (Halim & Zubaidah, 2013).

Bakteri asam laktat dapat bertahan pada garam empedu karena dapat menghasilkan enzim *Bile Salt Hydrolase (BSH)*. Enzim *Bile Salt Hydrolase (BSH)* menghidrolisa garam empedu, sehingga mengubah sifat fisika-kimia dari garam empedu menjadi tidak membahayakan lagi bagi bakteri asam laktat. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi reaksi empedu terhadap membran sel, antara lain konsentrasi empedu, jenis dan struktur empedu, serta arsitektur membran dan komposisi sel berperan penting dalam ketahanan empedu (Halim & Zubaidah, 2013).