# Potensi Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik Yang Diisolasi Dari Minuman Fungsional Teh Kombucha

*by* Ni Made Indri Hapsari Arihantana


| | | | |
|---|---|---|---|
| FILE | LAPORAN_AKHIR_KOMBUCHA_TURNITIN.PDF (1.24M) | | |
| TIME SUBMITTED | 12-FEB-2016 01:06AM | WORD COUNT | 11393 |
| SUBMISSION ID | 630806879 | CHARACTER COUNT | 68310 |

| | |
|---|---|
| Bidang Unggulan | : Kesehatan dan Obat-obatan |
| Kode/Nama Bidang Ilmu | : 169/Ilmu Pangan |

# LAPORAN AKHIR

## PENELITIAN HIBAH UNGGULAN PROGRAM STUDI

# POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT KANDIDAT PROBIOTIK YANG DIISOLASI DARI MINUMAN FUNGSIONAL TEH KOMBUCHA


TIM PENELITI

| | |
|---|---|
| Ni Made Indri Hapsari Arihantana, S.TP., MP | NIDN. 0026047805 |
| Ni Nyoman Puspawati, S.TP., M.Si | NIDN. 0010057901 |



**Dibiayai oleh:**
**DIPA PNBP Universitas Udayana**
**Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Penelitian**
**Nomor: 246-303/UN.14.02/PNL 01.03.00/2015**
**tanggal, 21 April 2015**



**PROGRAM STUDI ILMU DAN TEKNOLOGI PANGAN**
**FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN**
**UNIVERITAS UDAYANA**

**NOPEMBER 2015**

## HALAMAN PENGESAHAN

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | Judul Penelitian | : | Potensi Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik yang Diisolasi dari Minuman Fungsional Teh Kombucha |
| 2 | Ketua Peneliti | | |
| | a. Nama Lengkap | : | Ni Made Indri Hapsari Arihantana, S.TP., M.P. |
| | b. Jenis Kelamin | : | Perempuan |
| | c. NIP/NIDN | : | 197804262003122001/0026047805 |
| | d. Jabatan Struktural | : | - |
| | e. Jabatan Fungsional | : | Asisten Ahli |
| | f. Fakultas/Jurusan | : | Teknologi Pertanian/Ilmu dan Teknologi Pangan |
| | g. Pusat Penelitian | : | - |
| | h. Alamat | : | Kampus Unud Bukit Jimbaran |
| | i. Telp/Fax | : | (0361) 701801/0361-701801 |
| | j. Alamat Rumah | : | Jalan Sekarsari IX/10 Denpasar |
| | k. Telp/Fax/Email | : | 082147455979 |
| 3 | Jumlah Anggota Peneliti | : | 1 orang |
| 4 | Jumlah Mahasiswa | : | 2 orang |
| 5 | Pembiayaan | | |
| | Jumlah Biaya yang diajukan ke Fakultas | : | Rp. 25.000.000,- |

Bukit Jimbaran, 18 Nopember 2015

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Prof. Dr. Ir. I Made Sugitha, M.Sc.)
NIP. 19530512 198103 1 001

Ketua Peneliti,

(Ni Made Indri Hapsari Arihantana, S.TP., M.P)
NIP. 19780426 200312 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Udayana

(Dr. Ir. IDG. Mayun Permana, MS.)
NIP. 19591107 198603 1 004

# RINGKASAN

Teh kombucha merupakan salah satu jenis minuman yang sering dikonsumsi oleh masyarakat karena selain menyegarkan, minuman ini juga memiliki manfaat bagi kesehatan tubuh. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa teh kombucha dapat mengatasi masalah saluran pencernaan atau sembelit, memperbaiki kondisi tubuh, bermanfaat melawan arteriosclerosis, memulihkan fungsi alat pencernaan, bermanfaat bagi penderita stres mental, menawarkan racun dan membunuh sel kanker (Anon, 2012a). Hal ini disebabkan karena teh kombucha dibuat melalui proses fermentasi dan mengandung mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan atau dikenal dengan istilah probiotik. Selama proses fermentasi dan oksidasi berlangsung, terjadi bermacam-macam reaksi pada larutan teh manis secara asimilatif dan disimilatif. Mikroba pada teh memetabolisme gula, dan sebagai gantinya memproduksi zat-zat bermanfaat dalam minuman tersebut, seperti asam glukuronat, asam laktat, vitamin, asam amino, antibiotik, serta zat-zat lain. Proses fermentasi teh kombucha biasanya berlangsung secara alami dan spontan tanpa ada penambahan starter dari kultur mikroba murni. Hal ini menyebabkan jenis dan komposisi mikroba yang ada pada minuman fungsional ini sangat beragam. Jumlah dan jenis mikroba pada minuman teh kombucha sampai saat ini belum diketahui dengan pasti.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya potensi bakteri asam laktat yang memiliki sifat-sifat kandidat probiotik dari minuman fungsional teh kombucha yang selama ini sudah terbiasa dikonsumsi oleh masyarakat. Adapun tujuan khusus dari penelitian ini adalah: memperoleh isolat bakteri asam laktat dari minuman fungsional teh kombucha yang berpotensi sebagai isolat probiotik, dan mendapatkan strain baru bakteri asam laktat dari minuman fungsional teh kombucha yaitu *Lactobacillus* yang memiliki sifat sebagai probiotik melalui tahap karakterisasi fisik, biokimia dan sifat probiotik. Tujuan penelitian ini dapat dicapai dengan melakukan 3 tahap penelitian. Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yaitu tahap pertama: isolasi bakteri asam laktat dari minuman fungsional teh kombucha, tahap kedua: karakterisasi fisik dan biokimia bakteri asam laktat (*Lactobacillus*) dari minuman teh kombucha, tahap ketiga: karakterisasi *Lactobacillus* terseleksi untuk pengembangan bakteri probiotik isolat lokal Indonesia.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa mikroba yang berhasil diisolasi dari teh kombucha berasal dari jenis kapang, khamir dan bakteri, dimana bakteri asam laktat

yang berhasil diisolasi dari teh kombucha berumah 31 isolat. Berdasarkan sifat morfologis, fisik dan biokimianya, bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi memiliki sifat katalase negatif, Gram positif, bentuk batang dan bulat. Berdasarkan sifat ketahanannya terhadap pH rendah dan garam empedu, bakteri asam laktat memiliki ketahanan yang cukup tinggi terhadap pH rendah bahkan menunjukkan peningkatan populasi pada media yang mengandung garam empedu 0,5%.

## PRAKATA

Puji sukur penulis panjatkan kepada Ida Sang Hyang Widi Wasa berkat, rahmat dan karunianya laporan akhir penelitian ini dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Penelitian ini dibiayai oleh DIPA BLU Unud No. 023.04.2.415253/2015.

Dengan selesainya laporan akhir ini, penulis sampaikan ucapan terima kasih atas bantuan dan fasilitas yang diberikan kepada:

1. Rektor Universitas Udayana
2. Ketua LPPM Unud
3. Dekan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana
4. Pemilik Teh Kombucha "Werdi Gandrung", Puri Agung Batuan, Gianyar Bali
5. Kepala Laboratorium di lingkungan FTP Unud
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga bantuan tersebut bermanfaat untuk pendidikan khususnya dan pembangunan bangsa.

Bukit Jimbaran, 09 Nopember 2015

Peneliti

## DAFTAR ISI


| | Halaman |
|---|---|
| **HALAMAN SAMPUL** | i |
| **HALAMAN PENGESAHAN** | ii |
| **RINGKASAN** | iii |
| **PRAKATA** | v |
| **DAFTAR ISI** | vi |
| **DAFTAR TABEL** | viii |
| **DAFTAR GAMBAR** | ix |
| **DAFTAR LAMPIRAN** | x |
| **BAB I. PENDAHULUAN** | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Tujuan Khusus Penelitian | 2 |
| 1.3. Urgensi Penelitian | 2 |
| **BAB II. TINJAUAN PUSTAKA** | 4 |
| 2.1. Teh Kombucha sebagai Minuman Fungsional | 4 |
| 2.2. Fermentasi pada Teh Kombucha | 5 |
| 2.3. Mikroba pada Teh Kombucha | 7 |
| 2.4. Proses Pembuatan Teh Kombucha | 9 |
| 2.5. Bakteri Asam Laktat | 10 |
| 2.6. Probiotik | 11 |
| **BAB III. METODE PENELITIAN** | 14 |
| 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian | 14 |
| 3.2. Bahan Penelitian | 14 |
| 3.3. Alat Penelitian | 14 |
| 3.4. Tahapan Penelitian | 14 |
| 3.5. Penyajian dan Analisis Data | 20 |
| **BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN** | 21 |
| 4.1. Isolasi dan Pemurnian BAL dari Minuman Fungsional Teh Kombucha | 21 |
| 4.2. Karakterisasi Fisik dan Biokimia Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus*) Dari Minuman Teh Kombucha | 25 |
| 4.3. Karakterisasi *Lactobacillus* terseleksi sebagai kandidat probiotik | 31 |

**BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN** ..... 37
**DAFTAR PUSTAKA** ..... 38
**LAMPIRAN** ..... 41
Lampiran 1. Draft Artikel Ilmiah ..... 41
Lampiran 2. Dokumentasi Produk Penelitian ..... 51
Lampiran 3. Penggunaan Anggaran Penelitian..... 53
Lampiran 4. Logbook Kegiatan Penelitian ..... 56
Lampiran 5. Bukti Pembayaran Pajak Honor ..... 62

## DAFTAR TABEL


| No | Judul | Halaman |
|---|---|---|
| 1 | Total Mikroba, Total Bakteri Asam Laktat dan Total *Lactobacillus* dari Teh Kombucha ……... | 23 |
| 2 | Karakterisasi Fisik dan Biokimia Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari The Kombucha……. | 29 |
| 3 | Kemampuan Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat pada pH Rendah …… | 31 |
| 4 | Ketahanan Bakteri Asam Laktat terhadap Garam Empedu ..... | 34 |

## DAFTAR GAMBAR


| No | Judul | Halaman |
|---|---|---|
| 1 | Diagram Alir Penelitian ……..... | 15 |
| 2 | Nilai pH dan Total Asam Teh Kombucha …… | 22 |
| 3 | Morfologi beberapa Isolat Bakteri Asam Laktat yang Diisolasi dari Teh Kombucha ……... | 26 |
| 4 | Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat pada Media MRSB (sebagai kontrol) ……... | 32 |
| 5 | Kemampuan Pertumbuhan Bakteri Asam Laktat pada pH Rendah ((pH 2,0) …….. | 32 |
| 6 | Ketahanan Bakteri Asam Laktat terhadap Garam Empedu 0,5% …….. | 35 |

## DAFTAR LAMPIRAN


| No | Judul | Halaman |
|---|---|---|
| 1 | Draft Artikel Ilmiah …… | 30 |
| 2 | Dokumentasi Produk Penelitian ……... | 31 |
| 3 | Penggunaan Anggaran Penelitian …… | |
| 4 | Logbook Kegiatan Penelitian ……... | |

# BAB I. PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Kombucha adalah suatu ramuan minuman kuno, yang merupakan hasil dari simbiosis murni dari bakteri dan ragi kombucha yang berasal dari Asia Timur. Minuman tersebut sampai sekarang dikenal dengan nama teh kombucha (*kombucha tea*). Teh kombucha merupakan salah satu jenis minuman yang sering dikonsumsi oleh masyarakat karena selain menyegarkan, minuman ini juga memiliki manfaat bagi kesehatan tubuh. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa teh kombucha dapat mengatasi masalah saluran pencernaan atau sembelit, memperbaiki kondisi tubuh, bermanfaat melawan arteriosclerosis, memulihkan fungsi alat pencernaan, bermanfaat bagi penderita stres mental, menawarkan racun dan membunuh sel kanker (Anon, 2012a). Hal ini disebabkan karena teh kombucha dibuat melalui proses fermentasi dan mengandung mikroba hidup yang bermanfaat bagi kesehatan atau dikenal dengan istilah probiotik. Probiotik adalah pangan yang mengandung mikroorganisme hidup yang secara aktif dapat meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki keseimbangan flora usus jika dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah yang memadai (Fuller, 1989).

Teh kombucha *(kombucha tea)* merupakan produk minuman tradisional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan starter mikroba kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir) dan difermentasi selama 8-12 hari. Selama proses fermentasi dan oksidasi berlangsung, terjadi bermacam-macam reaksi pada larutan teh manis secara asimilatif dan disimilatif. Mikroba pada teh memetabolisme gula, dan sebagai gantinya memproduksi zat-zat bermanfaat dalam minuman tersebut, seperti asam glukuronat, asam laktat, vitamin, asam amino, antibiotik, serta zat-zat lain. Maka dari itu, jamur kombucha ini bagaikan sebuah pabrik biokimia mini dan minumannya dapat berperan sebagai minuman fungsional. Proses fermentasi teh kombucha biasanya berlangsung secara alami dan spontan tanpa ada penambahan starter dari kultur mikroba murni. Hal ini menyebabkan jenis dan komposisi mikroba yang ada pada minuman fungsional ini sangat beragam. Jumlah dan jenis mikroba pada minuman teh kombucha sampai saat ini belum diketahui dengan pasti. Hal ini menyebabkan teh kombucha memiliki peluang yang sangat besar sebagai sumber kekayaan hayati bagi pertumbuhan mikroba yang menguntungkan dan

membuka peluang yang besar untuk mengeksplorasi jenis mikroba apa yang terdapat didalamnya terutama mikroba yang bersifat menguntungkan yaitu bakteri asam laktat.

Adanya klaim yang menyatakan bahwa konsumsi bakteri asam laktat yang bersifat probiotik menyehatkan, menyebabkan terjadinya perburuan strain BAL dari berbagai sumber alami seperti saluran pencernaan manusia dan hewan serta makanan terfermentasi yang dibuat secara tradisional. Bakteri asam laktat yang bersifat probiotik umumnya diisolasi dari makanan yang melalui tahap fermentasi, salah satunya adalah teh kombucha. Melihat teh kombucha memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber BAL isolat lokal dan berpotensi sebagai probiotik maka perlu dilakukan penelitian yang mendasar untuk mengetahui potensi bakteri asam laktat dari teh kombucha dengan melakukan isolasi dan karakterisasi BAL yang terdapat dalam teh kombucha untuk pengembangan bakteri probiotik isolat lokal Indonesia.

### 1.2.Tujuan Khusus Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya potensi bakteri asam laktat yang memiliki sifat-sifat kandidat probiotik dari minuman fungsional teh kombucha yang selama ini sudah terbiasa dikonsumsi oleh masyarakat. Adapun tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Memperoleh isolat bakteri asam laktat dari minuman fungsional teh kombucha yang berpotensi sebagai isolat probiotik.
2. Mendapatkan strain baru bakteri asam laktat dari minuman fungsional teh kombucha yaitu *Lactobacillus* yang memiliki sifat sebagai probiotik melalui tahap karakterisasi fisik, biokimia, dan sifat probiotik.

### 1.3. Urgensi Penelitian

Adanya klaim yang menyatakan bahwa konsumsi bakteri asam laktat yang bersifat probiotik menyehatkan, menyebabkan terjadinya perburuan atau eksplorasi strain BAL dari berbagai sumber alami seperti saluran pencernaan manusia dan hewan serta makanan terfermentasi yang dibuat secara tradisional. Teh kombucha merupakan minuman fungsional yang dibuat melalui proses fermentasi. Proses fermentasi teh kombucha berlangsung secara alami dan spontan. Hal tersebut menyebabkan jumlah dan jenis mikroba yang memiliki dampak baik bagi kesehatan

yang tumbuh pada produk minuman fungsional ini sangat beragam. Melihat teh kombucha memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber BAL isolat lokal dan berpotensi sebagai probiotik maka perlu dilakukan penelitian yang mendasar untuk mengetahui potensi bakteri asam laktat dari teh kombucha dengan melakukan isolasi dan karakterisasi BAL yang terdapat dalam teh kombucha untuk pengembangan bakteri probiotik isolat lokal Indonesia. Hasil dari penelitian ini adalah diperolehnya isolat bakteri asam laktat yang memiliki sifat-sifat sebagai kandidat probiotik. Bakteri kandidat probiotik yang berhasil diisolasi dari minuman fungsional teh kombucha selanjutnya dapat diuji untuk pengembangan probiotik yang ke depannya dapat digunakan sebagai obat dalam menanggulangi masalah penyakit-penyakit degeneratif sehingga dapat mengurangi penggunaan obat-obatan kimia yang dapat memiliki efek negatif bagi kesehatan. Melihat penting dan besarnya manfaat yang diperoleh maka penelitian tentang potensi isolat bakteri asam laktat kandidat probiotik sangat perlu dilakukan dan dikembangkan.

# BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1. Teh Kombucha sebagai Minuman Fungsional

Kombucha adalah jamur teh yang berasal dari Asia Timur dan tersebar ke Jerman melalui Rusia sekitar pergantian abad ke-20. Teh kombucha (*kombucha tea*) merupakan produk minuman tradisional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan starter mikroba kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir) dan difermentasi selama 8-12 hari. Kombucha adalah suatu ramuan minuman kuno, yang merupakan hasil dari simbiosis murni dari bakteri dan ragi kombucha yang berasal dari Asia Timur.

Jamur kombucha merupakan membran jaringan jamur yang bersifat gelatinoid dan liat, serta berbentuk lempengan datar. Kombucha hidup dalam larutan teh manis yang kaya nutrisi dan tumbuh dengan cara germinasi. Pada mulanya, lempengan jamur tumbuh meluas pada permukaan teh lalu menebal, kemudian disusul oleh pertumbuhan lempengan berlapis-lapis dibawahnya yang akan menebal. Bila dirawat secara benar, jamur ini akan tumbuh pesat dan sehat. Selama proses fermentasi dan oksidasi berlangsung, terjadi bermacam-macam reaksi pada larutan teh manis secara asimilatif dan disimilatif. Jamur teh memakan gula, dan sebagai gantinya memproduksi zat-zat bermanfaat yang berada dalam minuman tersebut, seperti asam glukuronat, asam laktat, vitamin, asam amino, antibiotik, serta zat-zat lain. Maka dari itu, jamur kombucha ini bagaikan sebuah pabrik biokimia mini dan minumannya dapat berperan sebagai minuman fungsional.

Teh kombucha memiliki khasiat bagi kesehatan dan dari beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa teh kombucha dapat mengatasi masalah saluran pencernaan atau sembelit, memperbaiki kondisi tubuh, bermanfaat melawan arteriosclerosis, memulihkan fungsi alat pencernaan, bermanfaat bagi penderita stres mental, menawarkan racun dan membunuh sel kanker (Anon, 2012a). Khasiat teh kombucha sangat banyak, hal ini disebabkan karena kombucha tidaklah khusus membidik organ tubuh tertentu, namun mempengaruhi tubuh secara menyeluruh, dengan menstabilkan metabolisme tubuh dan menawarkan racun dengan asam glukuronat. Aktivitas ini menyebabkan peningkatan kapasitas pertahanan endogenis tubuh terhadap pengaruh beracun dan tekanan lingkungan, sehingga metabolisme sel yang rusak diperkuat, dan berlanjut dengan pemulihan kesehatan tubuh. Beberapa

sifat menyehatkan teh kombucha ini harus didukung oleh penelitian lebih lanjut. Namun, mekanisme aktif lainnya telah dibuktikan melalui pengujian dan percobaan ilmiah, seperti pada pengaturannya terhadap bakteri pada alat pencernaan, penguatan sel, detoksifikasi dan mengurangi kelebihan keringat, harmonisasi metabolis, efek antibiotik, dan memfasilitasi keseimbangan pH tubuh. Kandungan asam glukonat yang ada pada minuman kombucha mampu memperkuat daya kekebalan tubuh terhadap infeksi dari luar serta mempunyai kemampuan untuk mengikat racun dan mengeluarkannya dari tubuh lewat urine. Kandungan antimikroba pada minuman kombucha mampu menghambat pertumbuhan *Shigella sonmei*, *E. coli*, dan *Salmonella typhimurium*.

Khasiat dari minuman teh kombucha juga disebabkan karena selama proses fermentasi, kultur kombucha akan menghasilkan sejumlah alkohol, karbondioksida, vitamin B, vitamin C, serta berbagai jenis asam organik yang sangat penting bagi metabolisme manusia seperti asam asetat, asam glukonat, asam glukoronat, asam oksalat, dan asam laktat. Komposisi larutan media (teh) memengaruhi aroma dan rasa kombucha. Komposisi yang dimaksud adalah gula-gula residu, karbondioksida dan asam organik (terutama rasio antara asam asetat dengan asam glukonat). Asam asetat yang bersifat volatil menghasilkan aroma kuat dan menusuk serta aroma asam, sedangkan flavor asam yang dihasilkan adalah asam glukonat lembut.

### 2.2. Fermentasi Teh Kombucha

Minuman tradisional ini dibuat melalui proses fermentasi yang sangat sederhana. Mikroba yang berperan dominan pada minuman ini adalah *Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis jamur. Pada medianya yang sesuai, mikroba ini sangat cepat tumbuh dan memiliki kelangsungan hidup yang panjang.

Proses fermentasi dimulai ketika kultur mengubah glukosa menjadi alkohol dan $CO_2$, kemudian bereaksi dengan air membentuk asam karbonat. Glukosa berasal dari inversi sukrosa oleh khamir menghasilkan glukosa dan fruktosa. Acetobacter sebagai bakteri utama dalam kultur kombucha mengoksidasi etanol menjadi asetaldehid lalu kemudian menjadi asam asetat. Aktivitas biokimia yang kedua dari bakteri *Acetobacter* adalah pembentukan asam glukonat yang berasal dari oksidasi glukosa. Sukrosa akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa oleh khamir. Selanjutnya glukosa akan dikonversi menjadi asam glukonat melalui jalur fosfat

pentosa oleh bakteri asam asetat, sebagian besar fruktosa dimetabolis menjadi asam asetat dan sejumlah kecil asam glukonat. Bakteri asam laktat juga menggunakan glukosa untuk mensintesis selulosa mikroba. Fruktosa masih tertinggal sebagian dalam media fermentasi dan diubah menjadi bentuk yang lebih sederhana oleh mikroorganisme sehingga dapat digunakan sebagai substrat fermentasi dan pada saat yang bersamaan kultur fermentasi teh kombucha juga menghasilkan asam-asam organik lainnya.

Bakteri *A. xylinum* mengubah gula menjadi selulosa yang disebut nata atau pelikel dan melayang di permukaan medium. Jika nutrisi dalam medium telah habis dikonsumsi, kultur akan berhenti tumbuh tetapi tidak mati. Kultur akan aktif lagi jika memperoleh nutrisi kembali. Bakteri asam asetat memanfaatkan etanol untuk tumbuh dan memproduksi asam asetat. Adanya asam asetat menstimulasi khamir untuk memproduksi etanol kembali. Interaksi simbiosis ini ditemukan pada glukonobacter dan *S.cerevisiae*. Konsentrasi asam asetat dalam kombucha hanya meningkat sampai batas tertentu lalu mengalami penurunan. Hal ini terjadi karena pemanfaatan asam asetat lebih lanjut oleh *A.xylinum* ketika jumlah gula dalam media teh mulai habis. Penurunan kadar asam ini juga dikarenakan fermentasi etanol oleh khamir juga mengalami penurunan karena pH yang sangat rendah serta mulai habisnya gula dalam larutan.

*Acetobacter* juga mampu menghidrolisa sukrosa menggunakan levansukrase menjadi glukosa dan sebuah polisakarida fruktosa. Jenis gula (sukrosa, glukosa, fruktosa) memiliki pengaruh yang berbeda-beda terhadap pembentukan etanol dan asam laktat, namun konsentrasi gula secara individu hanya mempunyai pengaruh yang sangat kecil terhadap flavor kombucha. Selama proses fermentasi *kombucha tea* terjadi aktivitas mikroorganisme yang berlangsung secara simultan dan sekuensial. Proses fermentasi dimulai dengan aktivitas khamir yang memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dengan bantuan enzim ekstraseluler invertase dan selanjutnya glukosa direduksi menjadi etanol dan karbondioksida yang terbentuk bereaksi dengan air membentuk asam karbonat. Laju pemecahan sukrosa menjadi fruktosa lebih tinggi dibandingkan terhadap produksi glukosa. Kedua gula ini dapat digunakan oleh *A.xylinum* untuk memproduksi asam-asam organik dan biosintesis selulosa. *A.xylinum* tidak aktif memetabolisir fruktosa seperti halnya glukosa, sehingga fruktosa terakumulasi di dalam larutan.

Proses pembuatan teh kombucha tidak jauh berbeda seperti proses pembuatan nata de coco pada umumnya, dimana setiap proses fermentasi dipengaruhi oleh berbagai faktor yang mempengaruhi kelangsungannya. Faktor-faktor yang perlu diperhatikan dalam proses fermentasi adalah: ketersediaan nutrisi meliputi unsur C, N, P, dan K, pH medium sekitar 5,5, suhu fermentasi 23°C - 27°C dengan toleransi dalam kisaran 18°C - 35°C, ketersediaan udara namun tidak dalam bentuk aerasi aktif, tidak boleh ada goncangan atau getaran dan tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung.

Lama fermentasi akan berlangsung selama 4-14 hari. Pada fermentasi 10 hari, dengan kadar gula awal 8%, akan diperoleh fruktosa 25g/L, asam glukonat 3,1 g/L, dan asam asetat 2 g/L. Jika fermentasi diperpanjang menjadi 13 hari, maka fruktosa akan menjadi 15,03 g/L, asam glukonat 6,64 g/L dan asam asetat 8,61 g/L. Semakin lama fermentasi maka rasa teh kombucha akan semakin asam dan rasa manis akan semakin berkurang. Lama fermentasi yang disarankan adalah 14 hari karena gula telah benar-benar difermentasi dari minuman dan minuman memiliki rasa yang kuat seperti anggur. Setelah proses fermentasi selesai, jamur kombucha akan berubah warna menjadi kecoklatan, dan ramuan teh manis akan mengeluarkan sedikit buih. Jika warna jamur kombucha sudah menjadi coklat tua, dan ramuan teh manis mengeluarkan banyak buih, sebaiknya teh kombucha tidak diminum lagi, karena dikhawatirkan mengakibatkan efek samping.

### 2.3. Mikroba pada Teh Kombucha

Kultur kombucha mengandung berbagai macam bakteri dan khamir diantaranya *Acetobacter xylinum, A. aceti, A. pasteurianus, Gluconobacter, Brettanamyces bruxellensis, B. intermedius, Candida fomata, Mycoderma, Mycotorula, Pichia, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces, Torula, Torulaspora delbrueckii, torulopsis, Zygosaccharomyces bailii dan Z. rouxii.* Kultur kombucha berbentuk seperti *pancake* yang berwarna putih (pucat) dan bertekstur kenyal seperti karet dan menyerupai gel. Kultur yang disebut pelikel ini terbuat dari selulosa hasil metabolisme bakteri asam asetat. Kultur kombucha terletak mengapung di permukaan cairan atau kadang dijumpai tenggelam di dalam cairan teh kombucha. Kultur kombucha mencerna gula menjadi asam-asam organik, vitamin B dan C, serta asam amino dan enzim. Kultur ini juga berperan sebagai mikroorganisme probiotik yang baik bagi kesehatan.

Koloni kombucha mewakili hubungan simbiosis antara bakteri dan khamir. *Acetobacter xylinum* dalam aktivitasnya menunjukkan perannya sebagai bakteri utama dalam koloni kultur. Beberapa kombinasi bakteri-khamir dalam kombucha antara lain *Acetabacter* sp. dan *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, jumlah khamir yang terdapat di dalam koloni sangat bervariasi, namun yang paling sering ditemukan berasal dari genera *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* dan *Saccharomyces*. Rendahnya laju kontaminasi oleh mikroorganisme berbahaya (patogen dan pembusuk) menandakan bahwa kombucha juga dapat diproduksi sendiri tanpa adanya risiko pathogen bagi kesehatan. Keasaman produk kombucha relatif tinggi, yaitu dengan total asam sekitar 33 g/L, dan dalam jumlah ini kontaminan lain akan sulit tumbuh. Namun apabila fermentasi berlangsung terlalu lama, maka keasaman akan meningkat sangat jauh sehingga dapat membahayakan orang yang mengkonsumsinya.

pH yang rendah dan kondisi lingkungan yang anaerob menyebabkan viabilitas khamir dan bakteri menjadi menurun selama fermentasi berlangsung, namun masih ada beberapa genera baik khamir maupun bakteri yang tahan dalam kondisi tersebut. Langkah-langkah prosedur dilakukan sama seperti proses pembuatan *kombucha tea*, tetapi toplesnya bisa digunakan yang lebih kecil. Lapisan selulosa yang baru terbentuk dan seduhan teh yang sudah difermentasi dijadikan starter untuk pembuatan minuman *kombucha tea*. Agar diperoleh kepuasan maksimal dari minuman ini, biarkan minuman ini sekitar beberapa hari (sekurang-kurangnya 5 hari) setelah ditaruh dalam botol. Kegiatan bakteri terhenti karena minuman yang di dalam botol tanpa udara, sementara raginya terus bekerja. Jika botol benar-benar tertutup dengan baik, gas yang dihasilkan oleh kegiatan ragi, tidak bisa keluar, sehingga minuman yang berbuih halus biasa dihasilkan.

Pada proses fermentasi teh kombucha, akan dihasilkan berbagai komponen atau senyawa yang berperan penting bagi pembentukan aroma dan citarasa yang khas yaitu terbentuknya beraneka macam asam-asam organik. Komponen-komponen tersebut antara lain: asam laktat, asam asetat, asam malat, asam oksalat, asam glukonat, asam butirat, asam nukleat, asam amino dan enzim-enzim. Selain itu, pada proses fermentasi teh kombucha juga dapat dihasilkan vitamin C dan B serta bakteri dan khamir yang penting.

Asam laktat yang ada di dalam kombucha sebagian besar terdapat dalam bentuk L(+)-laktat. Asam laktat penting bagi sistem pencernaan manusia. Asam laktat juga digunakan sebagai indikator penyakit kanker. Asam asetat dapat menghambat

bakteri berbahaya sehingga sering digunakan menjadi pengawet. Asam asetat merupakan komponen yang memberi aroma dan rasa khas pada kombucha. Asam malat penting dalam proses detoksifikasi tubuh. Asam oksalat dapat berfungsi sebagai pengawet alami dan juga mendukung sel dalam memproduksi energi bagi tubuh. Asam glukonat efektif dalam infeksi yeast seperti *Candida*. Asam butirat diproduksi oleh khamir dan bekerja sama melawan infeksi khamir dengan asam glukonat. Asam nukleat berperan untuk meningkatkan regenerasi sel yang baik dan sehat. Asam amino merupakan sekelompok asam yang berperan dalam pembentukan protein. Asam amino penting dalam pembelahan sel dan memperbaiki jaringan yang rusak. Asam amino juga dapat membentuk antibodi yang dapat melawan bakteri dan virus. Enzim adalah bagian dari protein yang bertindak sebagai biokatalis, mempercepat laju reaksi biokimia dalam tubuh. Oleh karena itu, enzim akan meningkatkan fungsi-fungsi kesehatan kombucha dengan tubuh.

### 2.4. Proses Pembuatan Teh Kombucha

Proses produksi teh kombucha cukup sederhana dan mudah diaplikasikan untuk skala rumah tangga. Pada proses pembuatan minuman ini sebaiknya tidak dibuat dalam kapasitas besar dalam satu wadah sekaligus tapi lebih baik dalam ukuran yang kecil (2 liter). Proses pembuatan teh kombucha cukup sederhana seperti langkah-langkah berikut ini. Pertama diawali dengan membuat teh dengan cara biasa. Untuk per liter air, tambahkan 2 sendok teh hijau, hitam, atau teh-celup ke dalam air yang baru mendidih. Biarkan teh mengembang selama 15 menit. Selanjutnya saring teh atau pisahkan teh celupnya dari air. Tambahkan 70 - 100 gram gula putih untuk satu liter air teh kemudian aduk sampai merata. Biarkan cairan teh yang sudah mengandung gula tersebut dingin menyamai suhu ruangan tidak lebih tinggi dari 20 – 25$^{o}$C karena koloni kombucha akan mati bila berada dalam cairan yang panas. Bila suhu teh sudah sama dengan temperatur ruangan, masukkan ke dalam toples dari bahan stainless steel atau bahan gelas. Alat yang terbuat dari logam selain stainless steel akan menghasilkan produk yang kurang bagus karena asam yang terbentuk selama proses fermentasi akan bereaksi dengan logam.

Pada saat pertama kali memproduksi teh kombucha, sebaiknya lakukan inokulasi kultur dengan menambahkan cairan teh kombucha sebelumnya. Selanjutnya tutup wadah fermentasi dengan menggunakan kain yang rapat agar tidak terkontaminasi. Fermentasi berlangsung sekitar 8 - 12 hari, tergantung suhu. Semakin

hangat suhu ruangan, semakin cepat proses fermentasinya. Koloni kombucha memerlukan tempat yang tenang dan hangat dan tidak boleh digoyang dan dipindah-pindah. Suhu teh tidak boleh berada dibawah 20°C dan tidak lebih dari 30°C. Suhu yang ideal adalah diantara 23°C sampai 27°C (Anon, 2012[b]).

Terbentuknya kombinasi $CO_2$ dan asam-asam organik pada teh kombucha akan memberikan rasa khas minuman kombucha. Pada awal fermentasi masih terasa manis, namun kemudian hilang karena gula terurai. Pada waktu bersamaan, rasa asam muncul untuk tumbuh sebagai sebuah hasil dari kegiatan bakteri, sehingga terjadi proses transisi dari rasa manis ke rasa asam atau kelat. Jika ingin rasa yang agak sedikit manis, fermentasi dapat dihentikan lebih awal sedangkan untuk rasa yang lebih asam, ferementasi harus lebih lama.

### 2.5. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif, bersifat anaerob aerotoleran, tahan asam, fermentatif, berbentuk batang dan bulat, habitatnya harus kaya nutrisi (fastidious), komposisi basa nitrogen DNA kurang dari 50% mol G + C (Axelsson, 2004; Adam dan Moss, 1995). Bakteri tersebut umumnya bersifat katalase negatif tetapi kadang-kadang terdeteksi katalase semu pada kultur yang ditumbuhkan pada konsentrasi gula rendah. Pertumbuhannya membutuhkan karbohidrat yang dapat difermentasi (Pot *et al*., 1994).

Menurut Hayakawa (1992), bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang menguntungkan yang dapat memfermentasi gula sebagai sumber energi untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah besar dan jika memecah protein, tidak membentuk senyawa putrefaktif (senyawa yang berbau busuk).

Dalam produk pangan umumnya bakteri asam laktat tidak berbahaya dan memenuhi status GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Bakteri ini juga dapat memberi efek bermanfaat bagi manusia karena komponen metabolit yang dihasilkannya dapat menghambat bakteri enterik patogen, mengatasi masalah *lactose intolerance*, menurunkan kadar kolesterol, antimutagenik dan antikarsinogenik serta memperbaiki sistem kekebalan tubuh (Surono 1998).

Pada awalnya, bakteri asam laktat dibedakan menjadi 4 genus yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* dan *Pediococcus*, dimana didasarkan pada ciri morfologi, tipe fermentasi, perbedaan tumbuh pada suhu tertentu, konfigurasi

produksi asam laktat (D-asam laktat atau L-asam laktat), kemampuan tumbuh pada konsentrasi garam tinggi dan kemampuan toleransinya terhadap asam dan basa. Klasifikasi bakteri asam laktat selanjutnya berkembang berdasarkan perbedaan komposisi asam lemak pada membran sel, motilitas, urutan rRNA dan persentase guanin dan sitosin (% G dan % C) pada DNA (Pot *et al.*, 1994). Genus *Lactobacillus* berkembang menjadi *Lactobacillus* dan *Carnobacterium*, genus *Streptococcus* berkembang menjadi 4 yaitu: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* dan *Enterococcus*. Genus *Pediococcus* berkembang menjadi *Pediococcus*, *Tetragenococcus* dan *Aerococcus* sedangkan pada genus *Leuconostoc* tidak mengalami perubahan.

Menurut Fardiaz (1989), klasifikasi bakteri asam laktat yang tidak kalah penting adalah kemampuan dalam memfermentasi glukosa yang dibedakan menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri asam laktat homofermentatif dapat mengubah keseluruhan glukosa menjadi asam laktat sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif mempunyai kemampuan untuk memfermentasikan glukosa menjadi asam laktat, etanol atau asam asetat dan $CO_2$.

## 2.6. Probiotik

Probiotik adalah pangan mengandung mikroorganisme hidup yang secara aktif meningkatkan kesehatan dengan cara memperbaiki keseimbangan flora usus jika dikonsumsi dalam keadaan hidup dalam jumlah yang memadai (Fuller, 1989). FAO dan WHO (2001) mendefinisikan probiotik sebagai mikroorganisme hidup (bakteri atau khamir) yang apabila dikonsumsi atau digunakan dalam jumlah yang cukup dapat meningkatkan kesehatan yang mengkonsumsinya. Pada awalnya, definisi probiotik digunakan pada pemberian pakan ternak yang disuplementasi dengan mikroba untuk membantu hewan ternak khususnya dalam saluran pencernaannya. Dalam perkembangannya banyak dilakukan penelitian mengenai mekanisme probiotik dengan menggunakan hewan percobaan untuk diekstrapolasikan pada manusia (Pessi *et al.*, 1998; Fuller, 1999).

Menurut Shortt (1999), untuk dapat berfungsi sebagai isolat probiotik maka bakteri asam laktat harus memenuhi persyaratan antara lain:

1. Stabil terhadap asam lambung sehingga mampu bertahan dan hidup selama melalui lambung dan usus.

2. Stabil terhadap garam empedu dan mampu bertahan hidup selama berada pada bagian atas usus kecil.
3. Memproduksi senyawa antimikroba seperti asam laktat, hidrogen peroksida dan bakteriosin.
4. Mampu menempel dan mengkolonisasi sel usus manusia. Hal ini akan mampu meningkatkan kompetisi dengan mikroba patogen dan penyebab karsinogen.
5. Tumbuh baik dan berkembang dalam saluran pencernaan. Pada beberapa genus *lactobacili* dan bifidobakteria dapat tumbuh baik pada saluran pencernaan tanpa adanya oksigen.
6. Aman digunakan oleh manusia. Pengujian secara *in vivo* merupakan salah satu indikator bahwa probiotik tersebut dapat dikonsumsi oleh manusia.
7. Tahan terhadap mikrobisida dan spermisidal vaginal. Sifat ini diperlukan untuk probiotik yang ditujukan untuk mengobati infeksi saluran urinovaginal.
8. Koagregasi membentuk lingkungan mikroflora yang normal dan seimbang, koagregasi juga mencerminkan kemampuan interaksi antar kultur untuk saling menempel.

Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik harus tahan terhadap asam lambung dan garam empedu. Hal ini disebabkan karena bila isolat bakteri asam laktat masuk ke dalam saluran pencernaan manusia, maka isolat tersebut harus mampu bertahan dari pH asam lambung untuk mencapai usus. Waktu yang diperlukan mulai saat bakteri masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit (Chou dan Weimer, 1999). Jadi isolat bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik harus mampu bertahan dalam keadaan asam di lambung selama sedikitnya 90 menit

Ketahanan bakteri asam laktat yang akan digunakan sebagai probiotik terhadap garam empedu merupakan syarat penting yang harus dipenuhi. *Lactobacillus* merupakan mikroflora alami pada saluran pencernaan manusia dan mempunyai ketahanan yang bervariasi terhadap garam empedu.

Bakteri asam laktat sebelum diklaim memiliki peranan sebagai bakteri probiotik yang aman harus melalui berbagai uji keamnan dan studi secara klinis. Standar produk probiotik harus berdasarkan petunjuk (*guideline*) sebelum produk tersebut dipasarkan, kultur bakteri yang digunakan harus diuji kualitas dan kelayaknnya (Reid *et al.,* 2003). Strain bakteri yang akan digunakan harus dapat diidentifikasikan berdasarkan genus dan spesiesnya selanjutnya nomenklatur dari bakteri tersebut harus dilaporkan dan didaftarkan pada daftar nama bakteri (Approved

*List of Bacterial Names*). Selanjutnya strain bakteri tersebut harus diuji secara *in vivo* untuk mengetahui fungsi mikroorganisme tersebut di dalam tubuh dan secara *in vitro* untuk mengetahui pertahanan mikroorganisme itu terhadap pemakai. Kriteria keamanan bakteri yang diklaim memilki sifat probiotik diketahui melalui serangkaian pengujian yang meliputi: resistensi antibiotik, aktivitas metabolisme, produksi toksin, aktivitas hemolisis, infeksi terhadap hewan immunocompromissed, efek samping terhadap manusia, insiden lain terkait konsumen (Anon., 2008).

# BAB III. METODE PENELITIAN

## 3.1. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Udayana. Waktu pelaksanaan penelitian adalah April-November 2015.

## 3.2. Bahan Penelitian

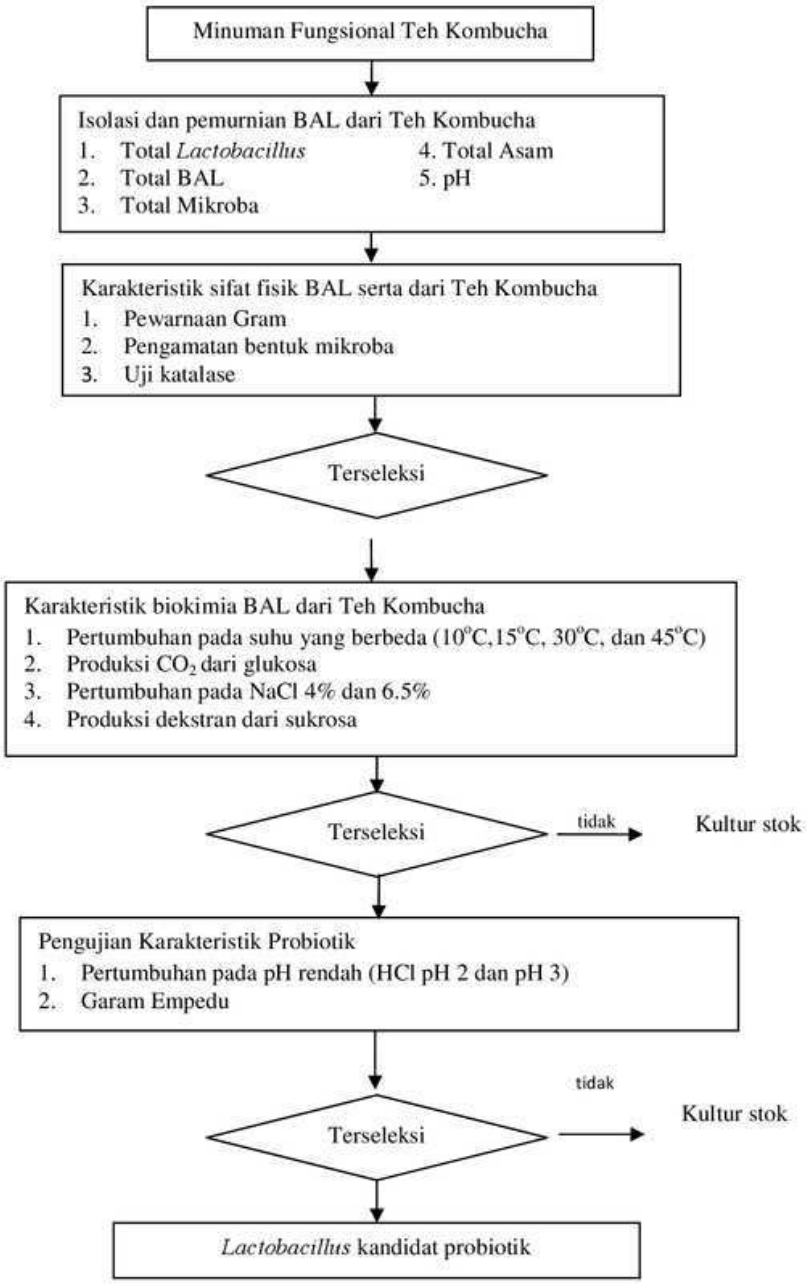
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sampel minuman teh kombucha, MRS Broth (Oxoid), MRS Agar (Oxoid), NaCl (Merck), Rogosa Agar (Oxoid), kristal violet, lugol, kertas tisu, etanol 95%, safranin, minyak imersi, $H_2O_2$ (3%), Media Gibson's semi solid tomato juice cair (empat bagian susu skim 10% ditambah dengan satu bagian *Nutrien agar* 10%, ditambah 0,25% *yeast exstract*, 5% glukosa dan 10% jus tomat), Media SA steril (trypton, yeast extract, $K_2HPO_4$, triamonium sitrat, sukrosa, dan bacto agar), Alkohol 70%, pepsin, saline, pankreatin, NaDC, kapas, aluminium foil, plastik tahan panas,spiritus.

## 3.3. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah autoklaf, inkubator, vortex, timbangan analitik, tabung reaksi, cawan petri, pipetman, rak tabung reaksi, gelas ukur, bunsen, jarum ose, gelas objek, cover glass, mikroskop, batang bengkok, sarung tangan, air laminar flow, hands glove, hot plate, magnetik stirer, koloni counter, eppendorf, *hoky steak*, shaker, sentrifuse.

## 3.4.Tahapan Penelitian

Penelitian ini (tahun pertama) terdiri dari tiga tahap yaitu tahap pertama: isolasi bakteri asam laktat dari minuman fungsional teh kombucha, tahap kedua: karakterisasi fisik dan biokimia bakteri asam laktat (*Lactobacillus*) dari minuman teh kombucha, tahap ketiga: karakterisasi *Lactobacillus* terseleksi sebagai kandidat probiotik. Secara garis besar tahapan penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.




Gambar 1. Diagram Alir Penelitian

**a. Penelitian Tahap I : Isolasi bakteri asam laktat dari Minuman Fungsional Teh Kombucha**

Penelitian tahap pertama dilakukan pengambilan sampel minuman fungsional teh kombucha dari produsen di Kabupaten Gianyar dan Denpasar. Pada sampel teh kombucha dilakukan proses isolasi bakteri asam laktat yang dilanutkan dengan tahap pemurnian isolat.

**a.1. Pengambilan Sampel dan Isolasi BAL dari Minuman Fungsional Teh Kombucha**

Sampel segar minuman fungsional teh kombucha diambil secara aseptis dan disimpan pada suhu 4°C sampai akan dianalisa. Sebanyak 1 ml sampel yang telah diencerkan ($10^0$, $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$) dengan larutan pengencer (garam fisiologis) ditumbuhkan pada media MRSA, dan Rogosa agar dengan suhu inkubasi 37°C selama 48 jam dalam kondisi aerob.

Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 48 jam dan penghitungan jumlah koloni untuk masing-masing cawan. Koloni pada media MRSA (aerob) menunjukkan total jumlah BAL sedangkan yang tumbuh pada media rogosa (aerob) menunjukkan adanya pertumbuhan laktbasili.

**a.2. Pemurnian Koloni yang Tumbuh pada Media MRSA dan Rogosa Agar**

Koloni yang tumbuh pada masing-masing media sangat beragam. Koloni bakteri akan berbentuk bulat kecil, oval, dan bulat besar yang tumbuh dipermukaan, tenggelam dan didasar cawan. Koloni yang berbeda bentuknya pada masing-masing cawan selanjutnya dipisahkan dan diinokulasikan pada MRSA dengan metode gores kuadran sehingga diperoleh koloni yang seragam dan terpisah.

**a.3. Total Asam (AOAC, 2000)**

Sebanyak 10 g sampel dimasukkan ke dalam labu takar lalu ditambahkan 25 ml alkohol netral, kemudian direfluks selama 10 menit. Setelah mendidih didinginkan lalu ditambahkan 3 tetes indikator phenolphthalein. Setelah itu dititrasi dengan KOH 0,1 N sampai berubah menjadi merah muda. Total asam dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total asam} = \frac{\text{ml titrasi KOH} \times \text{NKOH} \times 56{,}1}{\text{Berat contoh (g)}}$$

**b. Penelitian Tahap II : Karakterisasi fisik dan biokimia bakteri asam laktat (*Lactobacillus*) dari minuman teh kombucha.**

Penelitian pada tahap kedua *Lactobacillus* yang sudah berhasil diisolasi dan dimurnikan dengan bentuk yang seragam (hasil tahap I) selanjutnya dikarakterisasi secara fisik dan biokimia untuk mendapatkan isolat terseleksi kandidat probiotik. Karakterisasi fisik yang dilakukan meliputi: pewarnaan Gram, pengamatan bentuk mikroba, pengujian sifat katalase, sedangkan karakterisasi biokimia meliputi: kemampuan mikroba tumbuh pada suhu berbeda yaitu 10°C, 15°C, 30°C dan 45°C, kemampuan memproduksi $CO_2$ dari glukosa, memproduksi dekstran dari sukrosa, pertumbuhan mikroba pada NaCl 4% dan 6,5%.

**b.1. Pewarnaan Gram (Harrigan dan McCance, 1998)**

Sebanyak ose air steril diteteskan pada gelas objek ditambah dengan satu ose isolat yang disebarkan hingga rata, selanjutnya difiksasi hingga kering. Preparat ditambah satu tetes kristal violet dan didiamkan selama 1 menit, selanjutnya dibilas dengan air dan dikeringkan dengan kertas tisu. Preparat ditambah satu tetes lugol dan didiamkan selama 2 menit, selanjutnya dibilas dengan air mengalir kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. Preparat ditambah etanol 95% dan didiamkan selama 10-20 detik kemudian dibilas dengan air serta dikeringkan. Selanjutnya, preparat ditambah satu tetes safranin dan didiamkan selama 10-20 menit kemudian dibilas dengan air. Preparat dkeringkan dan diamati dibawah mikroskop hingga perbesaran 1000 kali (minyak imersi).

Jika preparat dibawah mikroskop berwarna merah menujukkan bahwa mikroba yang diamati adalah Gram negatif, maka tidak dilanjutkan untuk pengamatan selanjutnya (dieliminasi). Apabila preparat berwarna biru keunguan menunjukkan bahwa mikroba yang diamati adalah Gram positif. Isolat yang mempunyai sifat Gram positif digunakan untu pengujian selanjutnya.

**b.2. Pengamatan bentuk bakteri (Harrigan dan McCance, 1998)**

Preparat Gram positif yang diperoleh dari pengujian Gram, dilanjutkan pada pengamatan bentuk mikroba. Mikroba yang mempunyai bentuk kokus, streptokokus, basil pendek, basil panjang, basil bergandengan dan berbentuk basil mirip huruf Y (atau bentuk tulang) dilanjutkan untuk pengujian berikutnya.

**b.3. Uji katalase (Harrigan dan McCance, 1998)**

Sebanyak dua tetes $H_2O_2$ (3%) diteteskan pada gelas objek dan ditambah 1 ose isolat kultur. Dicampur rata dan diamati ada atau tidaknya gelembung $CO_2$ yang dapat dilihat melalui sisi bawah gelas objek. Adanya gelembung $CO_2$ menunjukkan mikroba bersifat katalase positif sedangkan yang tidak mengasilkan gelembung $CO_2$ menunjukkan mikroba bersifat katalase negatif. Isolat kultur yang bersifat katalase negatif dilanjutkan pada pengujian selanjutnya.

**b.4. Pertumbuhan pada Suhu Berbeda (Nuraida, 1988)**

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan tumbuh bakteri asam laktat pada suhu berbeda. Sebanyak 1 tetes kultur bakteri asam laktat diinokulasikan ke dalam tabung yang berisi medium MRSB. Inokulasi kultur bakteri asam laktat dibuat dalam 4 seri tabung yang selanjutnya setiap seri tabung diinkubasikan selama 7 – 14 hari pada suhu 10°C, 15°C, 30°C dan 45°C (4 hari). Perlakuan kontrol diinkubasikan pada suhu 37°C. Adanya pertumbuhan terlihat dengan adanya kekeruhan pada tabung.

**b.5. Produksi $CO_2$ dari Glukosa (Modifikasi Nuraida 1988 & Harrigan 1998)**

Pengujian ini bertujuan untuk membedakan bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif dan heterofermentatif. Medium yang digunakan adalah Gibson's semi solid tomato juice cair yang dibuat dengan cara sebagai berikut: empat bagian susu skim 10% ditambah dengan satu bagian *Nutrien agar* 10%, ditambah 0,25% *yeast exstract*, 5% glukosa dan 10% jus tomat dengan pH akhir 6,5. Selanjutnya media dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml dan disterilisasi. Sebelum media tersebut digunakan, suhunya diturunkan terlebih dahulu mencapai 45°C. Selanjutnya ditambahkan kira-kira 0,5 ml isolat bakteri asam laktat yang telah ditumbuhkan dalam MRSB selama 24 jam kemudian dituangkan agar cair diatasnya kira-kira 2-3 cm untuk menciptakan kondisi anaerobik. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 2-5 hari. Bakteri asam laktat yang bersifat heterofermentatif akan membentuk gas yang ditandai dengan pecahnya agar sedangkan homofermentatif tidak.

**b.6. Produksi Dekstran dari Sukrosa**

Uji ini dilakukan untuk membedakan spesies dari genus *Leuconostoc*. Medium sukrosa agar (SA) untuk 1 liter dibuat dengan cara mencampur 10 gr trypton; 5 gr *yeast extract*; 5 gr $K_2HPO_4$; 5 gr triamonium sitrat; 50 gr sukrosa; dan bacto agar 15 gr. Medium selanjutnya disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya media didistribusikan pada cawan steril.

Satu lup kultur bakteri asam laktat digoreskan pada sukrosa agar dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Bakteri asam laktat dari genus *Leuconostoc* akan menghasilkan dekstran yang ditandai dengan terbentuknya koloni mukoid (diselimuti lendir).

**b.7. Pertumbuhan pada Media Mengandung Garam atau NaCl (Nuraida, 1988)**

Pengujian ini untuk tujuan untuk mengetahui kemampuan BAL untuk tumbuh pada media yang mengandung kadar garam yang tinggi. Toleransi terhadap garam (4% dan 6.5% NaCl) umum digunakan untuk membedakan antara enterokoki/vagokoki, streptokoki. Media MRS broth yang ditambah 6.5% NaCl diinokulasi dengan 1 ose inokulum. Kultur kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 5 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya kekeruhan dan endapan.

**c. Penelitian Tahap III : Karakterisasi *Lactobacillus* terseleksi sebagai kandidat probiotik.**

Penelitian pada tahap ketiga adalah *Lactobacillus* yang sudah berhasil diseleksi berdasarkan sifat fisik dan biokimianya (hasil tahap II) selanjutnya dilakukan pengujian karakteristik kandidat probiotik. Penelitian tahap ini meliputi: kemampuan *Lactobacillus* dan *Bifidobacterium* terseleksi tumbuh pada pH rendah yaitu pH 2 dan pH 3 dan ketahanan terhadap garam empedu. Hasil dari penelitian tahap ini adalah spesies *Lactobacillus* yang berpotensi sebagai probiotik.

**c.1. Ketahanan terhadap pH rendah (Modifikasi Chou dan Weimer, 1999; Zavaglia *et al.*, 1998)**

Uji ketahanan terhadap asam dilakukan dengan metode *plate count* dengan modifikasi media. Ketahanan terhadap asam dilakukan dalam medium MRS broth yang diatur pada pH 2,0 menggunakan HCl 37%. Kultur yang telah disegarkan dalam MRS broth selama 24 jam, diinokulasikan ke dalam MRS broth kontrol dan MRS

broth yang telah diatur pada pH 2,0, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 0 dan 5 jam. Hal ini sesuai dengan lamanya makanan berada di lambung yaitu 2 – 6 jam (Gropper dan Groff, 2001). Setelah inkubasi dilakukan hitungan cawan pada MRSA dengan metode tuang dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Sel yang tahan terhadap pH rendah adalah persentase sel yang hidup setelah diinkubasi pada pH 2,0 selama 0 dan 5 jam. Ketahanan terhadap asam dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh pada waktu inkubasi 0 jam dengan 5 jam.

**c.2. Ketahanan terhadap Garam Empedu (Modifikasi Moser dan Savage, 2001; Ngatirah *et al.*, 2000)**

Uji ketahanan terhadap garam empedu dilakukan menurut Ngatirah *et al.* (2000) tetapi konsentrasi garam empedu yang digunakan sebesar 0,5% (Moser dan Savage, 2001). Konsentrasi ini dipilih karena ekuivalen dengan konsentrasi fisiologis garam empedu di dalam duodenum.

Sebanyak 1 ml kultur bakteri asam laktat dalam MRS broth berumur 24 jam dimasukkan ke dalam 9 ml MRS broth yang mengandung 0,5% garam empedu kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 0 dan 5 jam. Jumlah bakteri asam laktat dihitung dengan metode tuang pada media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Ketahanan terhadap garam empedu dihitung berdasarkan selisih unit log jumlah koloni yang tumbuh setelah inkubasi selama 0 jam dengan kultur yang tumbuh setelah diinkubasi selama 5 jam. Semakin kecil selisih maka semakin tinggi ketahanan kultur bakteri asam laktat yang diuji terhadap garam empedu.

## 3.5. Penyajian dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari serangkaian pengujian dianalisis dan dipaparkan secara deskriptif dan data ditampilkan dalam bentuk tabel, gambar atau foto.

# BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan pengambilan sampel dari 3 tempat yaitu daerah Batuan Gianyar (KB), Sidakarya Denpasar (KS), dan Sudirman Denpasar (KK). Dari 3 tempat pengambilan sampel diperoleh 31 isolat bakteri asam laktat.

## 4.1. Isolasi dan Pemurnian BAL dari Minuman Fungsional Teh Kombucha

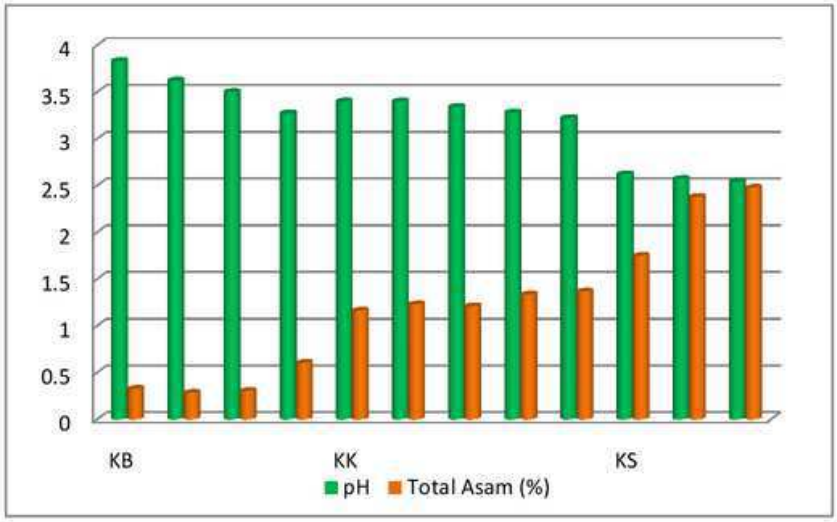
Isolasi merupakan suatu cara untuk memisahkan atau memindahkan mikroba tertentu dari lingkungannya sehingga diperoleh kultur atau biakan murni. Kultur murni tersebut merupakan kultur yang sel mikrobanya berasal dari pembelahan sel tunggal (Pelczar dan Chan, 1986). Kultur murni sangat diperlukan untuk menelaah dan mengidentifikasi mikroorganisme, termasuk menelaah ciri-ciri kultural, morfologis, fisiologis maupun serologis yang memerlukan suatu populasi yang terdiri dari satu macam mikroorganisme saja (Hadioetomo, 1993).

Teh kombucha merupakan minuman yang diproduksi melalui tahap fermentasi dengan melibatkan berbagai jenis mikroba. Proses fermentasi teh kombucha biasanya terjadi secara spontan dengan melibatkan mikroba yang ada secara alami di alam. Mikroba yang terlibat dari jenis khamir dan bakteri khususnya bakteri asam laktat. Adanya keterlibatan bakteri asam laktat menyebabkan teh kombucha yang dihasilkan memiliki citarasa asam. Karakteristik tek kombucha secara kimiawi maupun mikrobiologis berperan terhadap manfaat teh kombucha sebagai minuman fungsional yang sangat baik bagi kesehatan. Karakteristik kimia meliputi nilai pH dan total asam sedangkan karakteristik mikrobiologis meliputi total mikroba, total bakteri asam laktat, total *Lactobacillus* dimana didalamnya meliputi sifat pewarnaan Gram, bentuk morfologi bakteri dan sifat katalase bakteri asam laktat.

### 4.1.1. Nilai pH dan Total Asam Teh Kombucha

Proses fermentasi teh kombucha dengan melibatkan bakteri penghasil asam menyebabkan teh kombucha memiliki nilai pH cukup rendah dengan citarasa asam. Nilai pH dan total asam dari teh kombucha dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2 dapat dilihat bahwa pH teh kombucha berkisar antara 2,54 – 3,83 dan total asam berkisar antara 0,28% - 2,47%. Produk teh kombucha memiliki waktu fermentasi selama 14 hari, dimana hasil proses fermentasi terbesar adalah asam khususnya asam asetat dan asam laktat. Fermentasi dengan waktu yang lama akan

menghasilkan teh dengan rasa asam yang kuat. Selama pemeraman *Acetobacter xylinum* akan mensintesis gula menjadi selulosa dan asam asetat sehingga akan menurunkan pH sampai 2,0 – 3,0 (Naland, 2004).




Gambar 2. Nilai pH dan total asam teh kombucha

Gambar 2 menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi yang dilakukan maka nilai pH akan semakin menurun yang diikuti dengan peningkatan umlah total asamnya. Teh kombucha yang diperoleh dari daerah Gianyar (KB) memiliki nilai pH 3,83 pada waktu fermentasi 2 hari dan akan semakin menurun mencapai pH 3,27 pada waktu fermentasi 14 hari sedangkan total asam mengalami peningkatan dari 0,32% menjadi 0,60%. Teh kombucha yang diperoleh dari daerah Sudirman (KK) memiliki nilai pH 3,40 pada waktu fermentasi 3 hari dan akan semakin menurun mencapai pH 3,22 pada waktu fermentasi 7 hari sedangkan total asam mengalami peningkatan dari 1,17% menjadi 1,38%. Teh kombucha yang diperoleh dari daerah Sidakarya (KS) memiliki nilai pH 2,62 pada waktu fermentasi 2 hari dan akan semakin menurun mencapai pH 2,54 pada waktu fermentasi 4 hari sedangkan total asam mengalami peningkatan dari 1,75% menjadi 2,47%.

pH teh kombucha yang diambil dari daerah Sidakarya menunjukkan nilai terendah dibandingkan dengan teh kombucha yang diperoleh dari daerah Sudirman maupun Batuan Gianyar. Begitu pula dengan nilai total asamnya, dimana teh kombucha yang diperoleh dari daerah Sidakarya memiliki total asam tertinggi mencapai 2,47% dan terendah total asam teh kombucha daerah Sudirman dan terakhir dari daerah Batuan.

Rendahnya nilai pH teh kombucha disebabkan juga oleh mikroba yang berperan dalam proses fermentasi yang sebagian besar berasal dari golongan bakteri pembentuk asam terutama bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat. Asam merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan bakteri sesaat setelah memasuki fase stationer dalan siklus pertumbuhannya. Bakteri asam asetat akan memproduksi asam asetat sebagai metabolit sekunder sedangkan golongan bakteri asam laktat akan menghasilkan asam laktat sebagai metabolit sekundernya. Berdasarkan jenis metabolit sekunder yang dihasilkan, bakteri asam laktat diklasifikasikan dalam 2 kelompok yaitu bakteri asam laktat yang bersifat homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri asam laktat homofermentatif adalah bakteri asam laktat yang menghasilkan asam laktat sebagai metabolit utamanya sedangkan bkteri asam laktat heterofermentatif adalah bakteri asam laktat yang menghasilkan komponen-komponen lain selain asam laktat sebagai hasil metabolismenya seperti diasetil, CO, hidrogen peroksida dan bakteriosin.

### 4.1.2. Total Mikroba, Total BAL dan Total *Lactobacillus* dari Teh Kombucha

Mikroba yang berperan dalam fermentasi teh kombucha adalah kapang, khamir dan bakteri. Kapang, khamir, dan bakteri dihitung sebagai total mikroba yang terdapat pada teh kombucha. Bakteri yang ada pada teh kombucha berasal dari berbagai jenis seperti bakteri asam asetat, bakteri asam sitrat, bakteri asam laktat. Umlah bakteri asam laktat secara keseluruhan dihitung sebagai total bakteri asam laktat sedangkan total *Lactobacillus* merupakan bagian dari bakteri asam laktat. Hasil isolasi total mikroba, total BAL dan total *Lactobacillus* dari teh kombucha dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Total Mikroba, Total BAL dan Total *Lactobacillus* dari Teh Kombucha**

| No. | Kode Sampel | Inkubasi (hari) | Total Mikroba (cfu/ml) | Total BAL (cfu/ml) | Total *Lactobacillus* (cfu/ml) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. | KB | 2 | TBUD | $5,1 \times 10^{9}$ | $1,0 \times 10^{9}$ |
| | | 4 | $2,8 \times 10^{6}$ | $9,5 \times 10^{5}$ | $2,0 \times 10^{6}$ |
| | | 6 | $2,0 \times 10^{7}$ | 0 | 0 |
| | | 14 | $5,0 \times 10^{6}$ | $4.5 \times 10^{8}$ | 0 |
| 2. | KK | 3 | $5.4 \times 10^{7}$ | $5.8 \times 10^{7}$ | 0 |
| | | 4 | $2.6 \times 10^{4}$ | $1.8 \times 10^{3}$ | $3.1 \times 10^{4}$ |
| | | 5 | $2.1 \times 10^{4}$ | $1.4 \times 10^{3}$ | $2.4 \times 10^{4}$ |
| | | 6 | $2.0 \times 10^{3}$ | $1.8 \times 10^{3}$ | $1.9 \times 10^{3}$ |
| | | 7 | $1.4 \times 10^{4}$ | TBUD | TBUD |
| 3. | KS | 2 | $4.3 \times 10^{2}$ | $6.9 \times 10^{1}$ | $3.8 \times 10^{2}$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3 | $1.6 \times 10^{3}$ | $1.1 \times 10^{1}$ | $2.0 \times 10^{1}$ |
| | | 4 | $1.5 \times 10^{1}$ | $8.0 \times 10^{1}$ | $1.0 \times 10^{1}$ |

Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa semakin lama waktu fermentasi maka jumlah total mikroba, total BAL maupun total *Lactobacillus*. Nilai total mikroba dari sampel teh kombucha yang diperoleh dari daerah Batuan Gianyar (KB) mengalami penurunan sebesar 3 siklus log yaitu dari $10^9$ CFU/ml menjadi $2,8 \times 10^6$ CFU/ml, total bakteri asam laktat mengalami penurunan sebesar 1 siklus log pada akhir fermentasi di hari ke-14 yaitu dari berkisar $5,1 \times 10^9$ CFU/ml menjadi $4,6 \times 10^8$ CFU/ml sedangkan total *Lactobacillus* mengalami penurunan sebesar 9 siklus log selama 14 hari masa fermentasi yaitu dari $1,0 \times 10^9$ CFU/ml sampai tidak ada koloni *Lactobacillus* yang ditemukan.

Nilai total mikroba dari sampel teh kombucha yang diperoleh dari daerah Sudirman (KK) mengalami penurunan sebesar 3 siklus log yaitu dari $5,4 \times 10^7$ CFU/ml menjadi $1,4 \times 10^4$ CFU/ml, total bakteri asam laktat mengalami penurunan sebesar 3 siklus log pada akhir fermentasi di hari ke-7 yaitu dari berkisar $5,8 \times 10^7$ CFU/ml menjadi sekitar $10^4$ CFU/ml sedangkan total *Lactobacillus* mengalami peningkatan jumlah pada awal waktu fermentasi sampai akhir fermetasi yaitu sebesar $10^4$ CFU/ml.

Nilai total mikroba dari sampel teh kombucha yang diperoleh dari daerah Sidakarya (KS) mengalami penurunan sebesar 1 siklus log yaitu dari $4,3 \times 10^2$ CFU/ml menjadi $1,5 \times 10^1$ CFU/ml, total bakteri asam laktat tidak mengalami penurunan maupun peningkatan jumlah koloni sampai akhir ermentasi hari ke-4 dari $6,9 \times 10^1$ CFU/ml menjadi sekitar $8,1 \times 10^1$ CFU/ml sedangkan total *Lactobacillus* mengalami penurunan populasi sebesar 1 siklus log yaitu dari $3,8 \times 10^2$ CFU/ml menjadi sekitar $1,0 \times 10^1$ CFU/ml.

Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri yang menguntungkan yang dapat memfermentasi gula sebagai sumber energi untuk memproduksi asam laktat dalam jumlah yang besar. Secara garis besar dapat diketahui bahwa selama proses fermentasi akan terjadi penurunan populasi mikroba. Hal ini disebabkan selama proses fermentasi terjadi produksi asam yang cukup tinggi yang diikuti dengan penurunan pH médium. Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba adalah pH lingkungan. pH optimum untuk pertumbuhan bakteri berkisar antara 6,5-7,5. Nilai pH mínimum dan maksimum untuk pertumbuhan kebanyakan spesies

bakteri adalah 4 dan 9. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri berkaitan dengan aktivitas enzim. Enzim diperlukan untuk pertumbuhan bakteri dimana perannya sebagai pengkatalis reaksi-reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri. Jika pH lingkungan tidak optimal dan sesuai maka akan dapat mengganggu kerja enzim-enzim tersebut dan akhirnya mengganggu pertumbuhan bakteri itu sendiri (Pelczar dan Chan, 1986). Menurut Ouwehand diacu *dalam* Salminen dan Wright (2004), asam organik (asam laktat dan asam asetat) menyebabkan penurunan pH sitoplasma yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Hal ini disebabkan akumulasi anion yang terbentuk menyebabkan penurunan laju sintesis makromolekul dan mempengaruhi perpindahan senyawa melalui membran sel.

Dari hasil tahap isolasi dan pemurnian sel bakteri diperoleh 31 isolat bakteri asam laktat yang juga meliputi isolat *Lactobacillus* untuk dilanjutkan ketahap karakterisasi sifat fisik dan biokimianya, sedangkan isolat kapang dan khamir tidak dilanutkan untuk dikarakterisasi dan hanya disimpan dalam gliserol 20%.

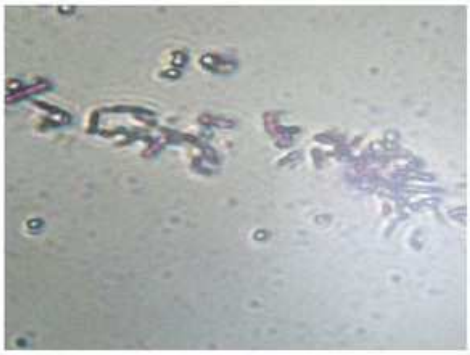
### 4.2. Karakterisasi Fisik dan Biokimia Bakteri Asam Laktat (*Lactobacillus*) Dari Minuman Teh Kombucha

Karakterisasi fisik dari teh kombucha meliputi pewarnaan gram, pengamatan bentuk mikroba dan uji katalase sedangkan karakterisasi biokimia bakteri asam laktat dari teh kombucha terdiri dari kemampuan pertumbuhan BAL pada suhu berbeda, dan kemampuan pertumbuhan BAL pada konsentrasi garam fisiologis yang berbeda serta kemampuan produksi $CO_2$ dari glukosa dan produksi dekstran dari sukrosa. Data hasil karakterisasi 31 isolat bakteri asam laktat dapat dilihat pada Tabel 2.

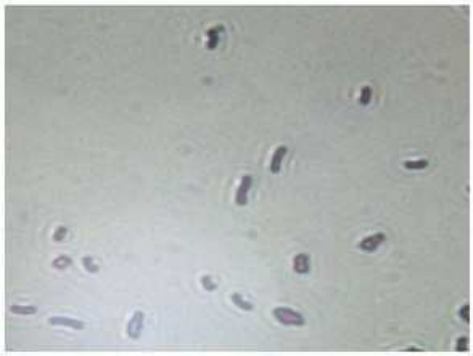
#### 4.2.1. Pewarnaan Gram, Bentuk Bakteri dan Sifat Katalase

Pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa dari 31 isolat bakteri asam laktat yang diperoleh diketahui sebanyak 29 isolat bersifat katalase negatif sedangkan 2 isolat bersifat katalase positif. Katalase negative merupakan cirri-ciri bakteri asam laktat, dimana kelompok bakteri asam laktat tidak mampu menghasilkan enzim katalase yang dapat memecah $H_2O_2$ menjadi oksigen. Katalase positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas saat isolate bakteri ditetesi dengan $H_2O_2$ konsentrasi 30%. Morfologi isolatbakteri asam laktat berbentu bulat (coccus) dan batang pendek

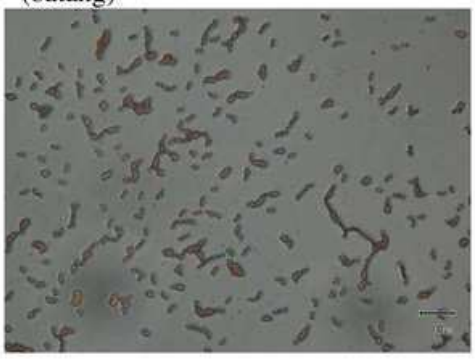
(basil), dengan sifat pewarnaan adalah Gram positif. Bentuk morfologi beberapa isolate bakteri asam laktat dapat dilihat pada Gambar 3.



a. Bentuk Morfologi Isolat KMK 31 (batang)



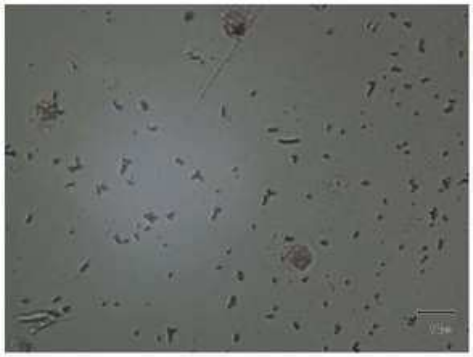
b. Bentuk Morfologi Isolat KMK 42 (batang)



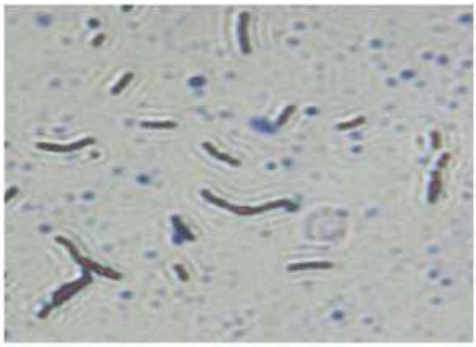
c. Bentuk Morfologi Isolat KMK 45 (batang)

d. Bentuk Morfologi Isolat KRB 210 (batang)

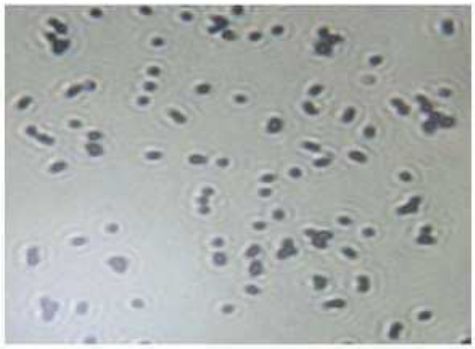
e. Bentuk Morfologi Isolat KRB 215 (batang)



f. Bentuk Morfologi Isolat KRK 22 (kokus)



g. Bentuk Morfologi Isolat KRK 41 (batang)



h. Bentuk Morfologi Isolat KRS 22 (kokus)

Gambar 3. Morfologi beberapa isolat bakteri asam laktat yang diisolasi dari Teh Kombucha

### 4.2.2. Kemampuan Pertumbuhan BAL Pada Suhu dan Konsentrasi Garam Fisiologis Yang Berbeda

Suhu yang digunakan untuk mengetahui kemampuan pertumbuhan BAL pada teh kombucha adalah 15ºC, 30ºC, 37ºC, dan 45ºC sedangkan konsentrasi garam fisiologis yang digunakan adalah 4% dan 6,5%. Pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa dari 31 isolat bakteri asam laktat yang diperoleh diketahui kemampuan pertumbuhan pada berbagai tingkat suhu cukup tinggi. Hampir seluruh isolatBAL (29 isolat) mampu tumbuh subur pada suhu 37$^{o}$C, 14 isolat mampu tumbuh subur pada suhu 15$^{o}$C, 28 isolat mampu tumbuh subur pada suhu 30$^{o}$C dan 23 isolat mampu tumbuh subur pada suhu 15oC, 28 isolat mampu tumbuh subur pada suhu 45$^{o}$C. Rentang suhu pertumbuhan bakteri asam laktat cukup luas dari 10$^{o}$C sampai 45$^{o}$C sehingga dapat dikatakan mampu tumbuh subur pada suhu dingin maupun panas.

### 4.2.3. Kemampuan produksi $CO_2$ dari glukosa dan produksi dekstran dari sukrosa

Kemampuan bakteri asam laktat menghasilkan $CO_2$ dan produksi dektran pada bakteri asam laktat dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa dari 20 isolat bakteri asam laktat, 18 isolat mampu menghasilkan $CO_2$ setelah diinkubasi dalam media yang mengandung glukosa. Kemampuan bakteri asam laktat menghasilkan $CO_2$ menunjukkan bakteri asam laktat berasal dari kelompok heterofermentatif. Berdasarkan produksi senyawa metabolitnya, bakteri asam laktat

dikelompokkan menjadi 2 yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Menurut Fardiaz (1989), klasifikasi bakteri asam laktat yang tidak kalah penting adalah kemampuan dalam memfermentasi glukosa yang dibedakan menjadi homofermentatif dan heterofermentatif. Bakteri asam laktat homofermentatif dapat mengubah keseluruhan glukosa menjadi asam laktat sedangkan bakteri asam laktat heterofermentatif mempunyai kemampuan untuk memfermentasikan glukosa menjadi asam laktat, etanol atau asam asetat dan $CO_2$.

Pada Tabel 2 juga menunukkan kemampuan bakteri asam laktat dalam memproduksi dekstran. Dari 20 isolat bakteri asam laktat, 15 isolat tidak mampu menghasilkan dekstran yang diproduksi dari sukrosa. Kemampuan bakteri asam laktat dalam menghasilkan dekstran menunukkan bahwa bakteri tersebut berasal dari genus Leuconostoc.

Tabel 2. Karakterisasi Fisik dan Biokimia Bakteri Asam Laktat yang diisolasi dari Teh Kombucha

| No | Kode Isolat | Deskripsi Koloni | Uji Katalase | Pertumbuhan pada suhu… | | | | Pertumbuhan pada garam NaCl | | Produksi $CO_2$ | Produksi Dekstran |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 15°C | 30°C | 37°C | 45°C | 4% | 6.50% | | |
| 1 | KMB 22 | Bulat | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 2 | KMB 23 | Pipih | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 3 | KMB 41 | Bulat besar | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 4 | KMB 44 | Bulat kecil | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 5 | KMB 146 | Bulat- | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 6 | KMB 147 | Bulat- | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 7 | KMK 31 | Bulat pipih | + | | | +++ | | | | - | |
| 8 | KMK 42 | Bulat sedang | - | | | +++ | | | | - | |
| 9 | KMK 45 | Bulat | - | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | - | - |
| 10 | KRB 22 | Bawah | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | - |
| 11 | KRB 23 | Atas | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | - |
| 12 | KRB 24 | Bawah | - | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | - | - |
| 13 | KRB 25 | Bawah | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 14 | KRB 26 | Atas | - | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | - | - |
| 15 | KRB 27 | Bawah | - | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ | - | - |
| 16 | KRB 29 | Bawah besar datar | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 17 | KRB 210 | Miring oval besar | - | ? | ? | +++ | ? | ? | ? | - | ? |
| 18 | KRB 214 | Miring oval besar | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 19 | KRB 215 | Bulat di bawah | - | ++ | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ | - | - |
| 20 | KRB 216 | Bulat di bawah | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 21 | KRK 21 | - | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22 | KRK 22 | Bintang besar | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 23 | KRK 41 | Bulat besar di dasar | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | - | - |
| 24 | KRK 42 | Bulat pipih besar miring | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | - | - |
| 25 | KRK 53 | Bawah kecil | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 26 | KRK 61 | Bulat besar | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 27 | KRK 62 | Bawah kecil | - | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |
| 28 | KRK 72 | Bulat kecil | - | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | ++ | - | - |
| 29 | KRS 21 | Agak menempel | - | ++ | +++ | + | +++ | ++ | ++ | - | |
| 30 | KRS 22 | Koloni Agak menempel | - | ++ | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | - | |
| 31 | KRS 51 | Bulat besar | - | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - | - |

### 4.3. Karakterisasi *Lactobacillus* Terseleksi Sebagai Kandidat Probiotik

Dari hasil pengujian terhadap minuman fungsional teh kombucha tahap pertama yaitu: isolasi bakteri asam laktat dan tahap kedua yaitu: karakterisasi fisik dan biokimia bakteri asam laktat (*Lactobacillus*) diperoleh 31 isolat bakteri asam laktat.

Dari 31 isolat dilakukan karakterisasi *Lactobacillus* terseleksi sebagai kandidat probiotik yang meliputi kemampuan pertumbuhan BAL pada pH rendah serta ketahanan BAL terhadap garam empedu dan didapatkan 20 isolat.

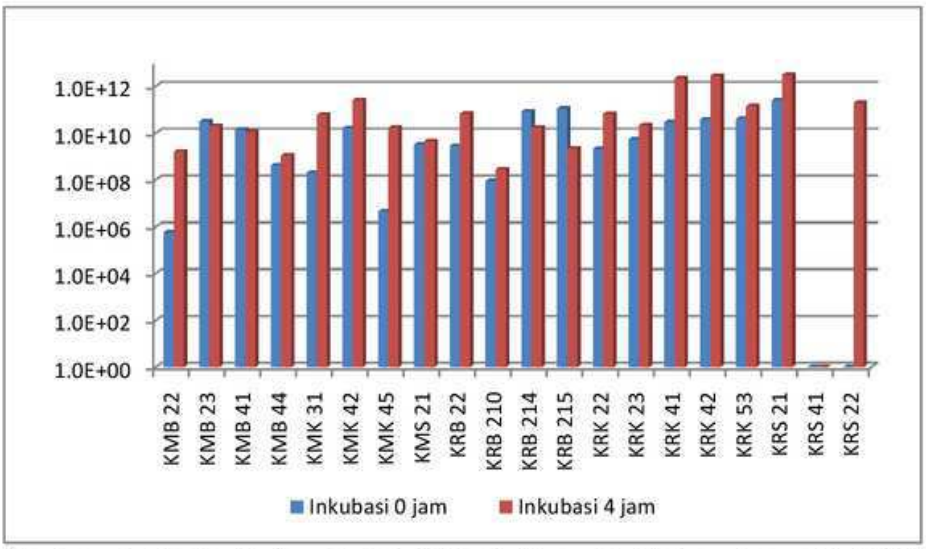
#### 4.3.1. Kemampuan Pertumbuhan BAL Pada pH Rendah

Kemampuan untuk bertahan pada pH rendah yaitu pH 2,0 ditunjukkan oleh 20 isolat. Ketahanan bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media yang diatur pH 2,0 dengan HCl. Ketahanan bakteri asam laktat terhadap pH rendah diketahui dengan menghitung selisih jumlah bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media yang mengandung asam selama 0 jam dan 4 jam yang kemudian dibandingkan dengan kontrol yaitu pertumbuhan bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media MRSB. Menurunnya total bakteri asam laktat setelah inkubasi dalam media yang mengandung asam selama 4 jam dapat dilihat pada Tabel 3, Gambar 4 dan Gambar 5.

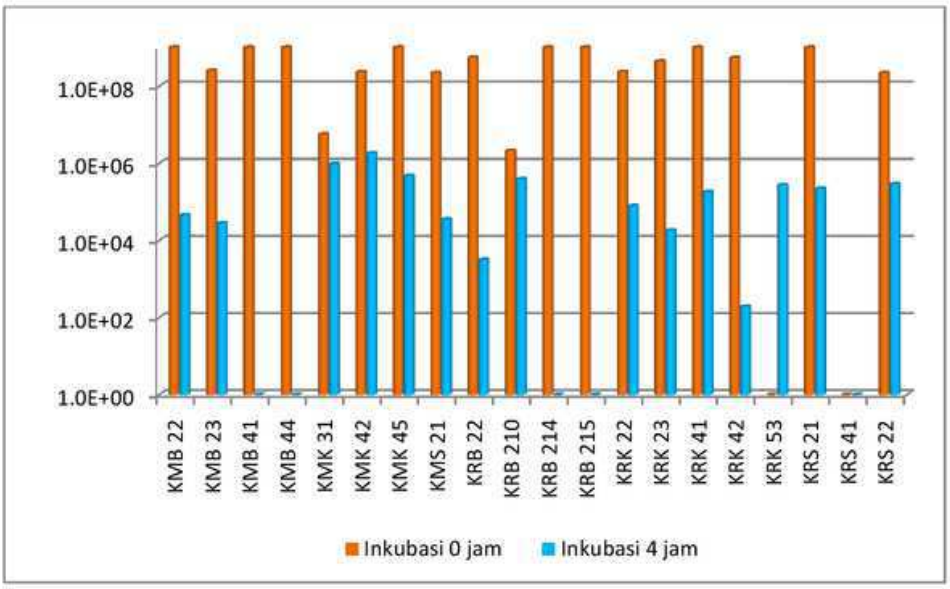
**Tabel 3. Kemampuan Pertumbuhan BAL Pada pH Rendah**

| No. | Kode Isolat | Kontrol | | pH 2.0 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 jam | 4 jam | 0 jam | 4 jam |
| 1 | KMB 22 | $5.6 \times 10^{5}$ | $1.6 \times 10^{9}$ | $3.1 \times 10^{9}$ | $4.5 \times 10^{4}$ |
| 2 | KMB 23 | $3.1 \times 10^{10}$ | $2.0 \times 10^{10}$ | $2.5 \times 10^{8}$ | $2.8 \times 10^{4}$ |
| 3 | KMB 41 | $1.4 \times 10^{10}$ | $1.1 \times 10^{9}$ | $2.3 \times 10^{9}$ | 0 |
| 4 | KMB 44 | $4.1 \times 10^{8}$ | $5.6 \times 10^{8}$ | $4.4 \times 10^{9}$ | 0 |
| 5 | KMK 31 | $2.0 \times 10^{8}$ | $6.1 \times 10^{10}$ | $5.6 \times 10^{6}$ | $9.6 \times 10^{5}$ |
| 6 | KMK 42 | $1.6 \times 10^{10}$ | $2.6 \times 10^{11}$ | $2.3 \times 10^{8}$ | $1.8 \times 10^{6}$ |
| 7 | KMK 45 | $4.4 \times 10^{6}$ | $1.7 \times 10^{10}$ | $1.9 \times 10^{9}$ | $4.7 \times 10^{5}$ |
| 8 | KMS 21 | $3.2 \times 10^{10}$ | $4.4 \times 10^{9}$ | $2.2 \times 10^{8}$ | $3.5 \times 10^{4}$ |
| 9 | KRB 22 | $2.8 \times 10^{9}$ | $6.7 \times 10^{10}$ | $5.5 \times 10^{8}$ | $3.1 \times 10^{3}$ |
| 10 | KRB 210 | $9.0 \times 10^{7}$ | $2.8 \times 10^{8}$ | $2.1 \times 10^{6}$ | $3.9 \times 10^{5}$ |
| 11 | KRB 214 | $8.3 \times 10^{10}$ | $1.7 \times 10^{10}$ | $2.3 \times 10^{9}$ | 0 |
| 12 | KRB 215 | $1.1 \times 10^{11}$ | $2.2 \times 10^{9}$ | $7.4 \times 10^{9}$ | 0 |
| 13 | KRK 22 | $2.1 \times 10^{9}$ | $6.6 \times 10^{10}$ | $2.3 \times 10^{8}$ | $7.8 \times 10^{4}$ |
| 14 | KRK 23 | $5.4 \times 10^{9}$ | $2.1 \times 10^{10}$ | $4.4 \times 10^{8}$ | $1.8 \times 10^{4}$ |
| 15 | KRK 41 | $2.9 \times 10^{10}$ | $2.2 \times 10^{12}$ | $1.5 \times 10^{9}$ | $1.8 \times 10^{5}$ |
| 16 | KRK 42 | $3.8 \times 10^{9}$ | $2.8 \times 10^{12}$ | $5.4 \times 10^{8}$ | $1.9 \times 10^{2}$ |
| 17 | KRK 53 | $4.0 \times 10^{10}$ | $1.4 \times 10^{11}$ | 0 | $2.7 \times 10^{5}$ |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 18 | KRS 21 | $2.5 \times 10^{11}$ | $3.0 \times 10^{12}$ | $1.6 \times 10^{9}$ | $2.2 \times 10^{5}$ |
| 19 | KRS 41 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | KRS 22 | 0 | $1.9 \times 10^{11}$ | $2.2 \times 10^{8}$ | $2.9 \times 10^{5}$ |




**Gambar 4. Pertumbuhan Isolat Bakteri Asam Laktat pada media MRSB (sebagai kontrol)**




**Gambar 5. Kemampuan Pertumbuhan BAL pada pH Rendah (pH 2,0)**

Ketahanan BAL hidup pada media dengan pH 2,0 perlu diketahui untuk mengetahui kemampuannya hidup dan bertahan terhadap pH lambung. Dari 20 isolat BAL yang diisolasi dari teh kombucha, 14 isolat mempunyai kemampuan untuk

mentoleransi keasaman lambung yang ditandai dengan kemampuan bertahan hidup selama 4 jam pada pH 2.

Pada Gambar 5 dapat diketahui bahwa bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media asam semuanya mengalami penurunan. Penurunan populasi total bakteri asam laktat berkisar antara 0,73 - 6,45 siklus log atau sekitar 0,73 – 100%. Penurunan tertinggi terjadi pada isolat KMB 41, KMB 44, KRB 214 dan KRB 215 yaitu sebesar 100% sedangkan 14 isolat lainnya memiliki ketahanan cukup tinggi meskipun tetap mengalami penurunan populasi. Ketahanan isolat BAL tertinggi dimiliki isolat KMK31 sebesar 88,65% dengan penurunan jumlah populasi sebesar 0,77 log cfu/ml, isolat KRB 210 sebesar 88,44% dengan penurunan sebesar 0,73 log CFU/ml, isolat KMK 42 sebesar 74,81% dengan penurunan sebesar 2,11 log cfu/ml dan isolat KRS 22 sebesar 65,48% dengan penurunan sebesar 2,88 log CFU/ml.

Media pertumbuhan dengan keasaman yang tinggi (pH 2,0) memiliki sifat merusak yang sangat kuat terhadap semua isolat yang diuji. Hal ini ditunjukkan dari penurunan jumlah sel setelah diinkubasi selama 4 jam. Penghambatan asam terhadap pertumbuhan sel bakteri terjadi melalui efek denaturasi enzim-enzim yang ada dipermukaan sel, kerusakan lipopolisakarida dan membran luar serta penurunan pH sitoplasma melalui peningkatan permeabilitas membran terhadap proton pada gradien pH yang sangat besar (Puspawati, 2008).

Isolat yang sedikit mengalami penurunan sel pada kondisi asam, diduga memiliki mekanisme ketahanan terhadap asam. Asam lambung (HCl) termasuk asam kuat yang terdisosiasi dalam medium dan mampu menurunkan pH eksternal tetapi tidak dapat menembus membran sel. Adaptasi struktur membran luar merupakan mekanisme resistensi bakteri terhadap asam yang tergolong asam kuat. Adaptasi dapat berupa perubahan komposisi asam lemak dan fosfolipid membran. Hal yang serupa juga ditunjukkan dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Jacobsen (1999), dimana dilakukan pengujian ketahanan asam terhadap 47 galur bakteri asam laktat dari berbagai sumber pada pH 2,5. Dari hasil pengujian tersebut hanya 29 galur bakteri yang mampu bertahan pada pH 2,5 dan tidak ada satupun yang mampu tumbuh setelah inkubasi selama 4 jam.

Bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai probiotik harus tahan terhadap asam lambung. Menurut (Chou dan Weimer, 1999), waktu yang diperlukan mulai saat bakteri masuk sampai keluar dari lambung sekitar 90 menit. Jadi isolat bakteri asam laktat yang digunakan sebagai probiotik harus mampu bertahan dalam keadaan asam

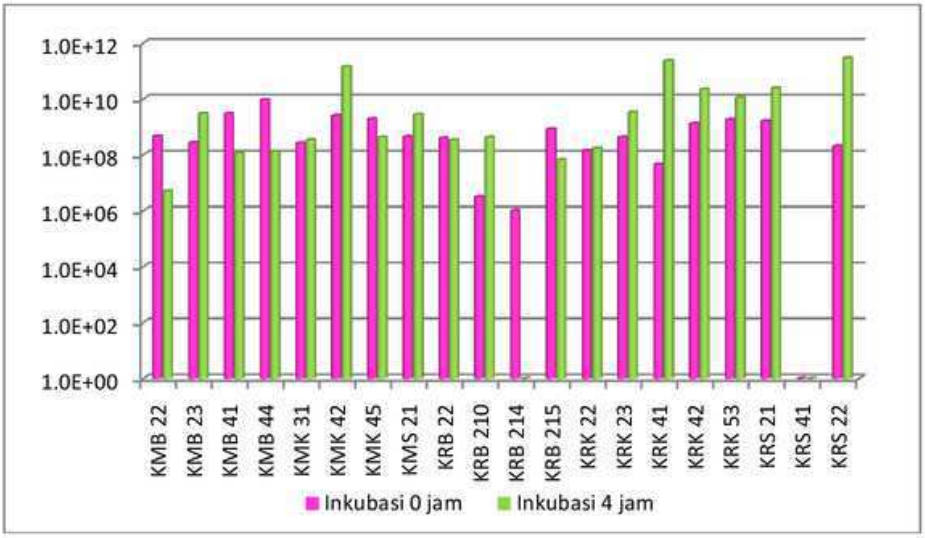
di lambung selama sedikitnya 90 menit. Semakin rendah penurunan populasi bakteri asam laktat maka kultur tersebut semakin tahan terhadap pH rendah.

### 4.3.2. Ketahanan BAL Terhadap Garam Empedu

Kemampuan untuk bertahan pada 0,5% garam empedu ditunjukkan oleh 20 isolat. Ketahanan bakteri asam laktat yang ditumbuhkan pada media yang mengandung garam empedu dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 5.

**Tabel 4. Ketahanan BAL Terhadap Garam Empedu**

| No. | Kode Isolat | Oxgall 0.5% | |
|---|---|---|---|
| | | 0 jam | 4 jam |
| 1 | KMB 22 | $4.6 \times 10^{8}$ | $5.0 \times 10^{6}$ |
| 2 | KMB 23 | $2.7 \times 10^{8}$ | $3.0 \times 10^{9}$ |
| 3 | KMB 41 | $2.9 \times 10^{9}$ | $1.1 \times 10^{8}$ |
| 4 | KMB 44 | $9.2 \times 10^{9}$ | $1.3 \times 10^{8}$ |
| 5 | KMK 31 | $2.6 \times 10^{8}$ | $3.4 \times 10^{8}$ |
| 6 | KMK 42 | $2.5 \times 10^{9}$ | $1.4 \times 10^{11}$ |
| 7 | KMK 45 | $1.9 \times 10^{9}$ | $4.2 \times 10^{8}$ |
| 8 | KMS 21 | $4.4 \times 10^{8}$ | $2.7 \times 10^{9}$ |
| 9 | KRB 22 | $3.9 \times 10^{8}$ | $3.3 \times 10^{8}$ |
| 10 | KRB 210 | $3.1 \times 10^{6}$ | $4.2 \times 10^{8}$ |
| 11 | KRB 214 | $1.0 \times 10^{6}$ | 0 |
| 12 | KRB 215 | $8.2 \times 10^{8}$ | $6.5 \times 10^{7}$ |
| 13 | KRK 22 | $1.4 \times 10^{8}$ | $1.7 \times 10^{8}$ |
| 14 | KRK 23 | $4.2 \times 10^{8}$ | $3.3 \times 10^{9}$ |
| 15 | KRK 41 | $4.5 \times 10^{7}$ | $2.3 \times 10^{11}$ |
| 16 | KRK 42 | $1.3 \times 10^{9}$ | $2.2 \times 10^{10}$ |
| 17 | KRK 53 | $1.8 \times 10^{9}$ | $1.1 \times 10^{10}$ |
| 18 | KRS 21 | $1.6 \times 10^{9}$ | $2.4 \times 10^{10}$ |
| 19 | KRS 41 | 0 | 0 |
| 20 | KRS 22 | $2.0 \times 10^{8}$ | $2.9 \times 10^{11}$ |




Gambar 6. Ketahanan Bakteri Asam Laktat terhadap Garam Empedu 0,5%

Pada Tabel dan Gambar 5 dapat diketahui bahwa dari 20 isolat yang diuji ketahanannya terhadap garam empedu, 18 isolat memiliki kemampuan yang cukup tinggi. Hal ini diketahui dari penurunan jumlah populasi yang cukup rendah bakhan ada beberapa isolat yang menunukkan peningkatan populasi setelah masa inkubasi selama 4 am dalam media yang mengandung 0,5% garam empedu. Penurunan jumlah populasi tertinggi teradi pada isolat KMB 22 yaitu sebesar 2 siklus log, dan 4 isolat menunukkan penurunan populasi sebesar 1 siklus log yaitu isolat KMB 41, KMB 44, KMK 45, KRB 215. Terdapat 3 isolat tidak menunukkan perubahan jumlah total koloni yaitu isolat KMK 31, KRB 22 dan KRK 22, seangkan 1 isolat yaitu isolat isolat KRB 214 menunjukkan penurunan yang cukup besar yaitu sebesar 6 siklus log dari total koloni 1.0 x $10^6$ CFU/ml menjadi 0 koloni, sedangkan sisanya sebanyak 10 isolat menunjukkan peningkatan populasi koloni setelah masa inkubasi 4 jam.

Kemampuan mentoleransi empedu 0,5% merupakan syarat yang penting dimiliki oleh bakteri probiotik. Media kultur bakteri dengan konsentrasi garam empedu sebesar 0,25%-0,5% merupakan konsentrasi efektif minimal untuk menyeleksi galur yang resisten terhadap garam empedu. Bakteri yang berhasil hidup setelah ditumbuhkan dalam media MRSA yang mengandung 0,5% garam empedu dinyatakan bersifat tahan terhadap garam empedu (Bridson, 1998).

*Lactobacillus* merupakan mikroflora alami pada saluran pencernaan manusia dan mempunyai ketahanan yang bervariasi terhadap garam empedu. Garam empedu disintesis dalam hati dari kolesterol yang menghasilkan senyawa asam empedu primer. Asam empedu ini berkonjugasi dengan glisin dan taurin dan disekresikan ke dalam kantong empedu sebagai asam empedu terkonjugasi. Asam empedu di dalam kantung empedu dilepaskan ke dalam lumen duodenum dalam bentuk misel dengan asam lemak dan gliserol yang dihasilkan oleh pencernaan lipase pankreatik.

Sekresi asam empedu ke dalam usus kecil manusia setiap hari berfungsi untuk membantu absorpsi lemak pada makanan, kolesterol, vitamin yang larut lemak (hidrofobik) dan senyawa larut lemak yang lain. Asam empedu terkonjugasi akan diserap dari usus kecil (sekitar 97 %) dan dikembalikan ke dalam hati sedangkan sebagian kecil (250 – 400 mg) yang tidak terserap akan hilang dari tubuh manusia sebagai asam empedu bebas di feses. Mekanisme penyerapan, sintesis kembali dan sekresi asam empedu di usus halus dan usus besar dikenal sebagai sirkulasi hepatik (Surono 2004).

Beberapa jenis *Lactobacillus* mempunyai enzim yang dapat menghidrolisis garam empedu yaitu bile salt hydrolase (BSH). Enzim ini mampu mengubah kemampuan fisik-kimia yang dimiliki oleh garam empedu sehingga menjadi bersifat tidak beracun bagi bakteri asam laktat (Smet *et al.* 1995). Semakin tinggi konsentrasi garam empedu akan mempengaruhi jumlah bakteri asam laktat dimana jumlahnya akan semakin menurun (Ngatirah *et al.* 2000; Kusumawati 2002). Hal ini disebabkan karena terjadinya peningkatan aktivitas enzim β-galaktosidase terhadap garam empedu sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Peningkatan permeabilitas membran sel dapat meningkatkan keluarnya materi intraseluler dari dalam sel dan bila terus terjadi dapat menyebabkan lisis pada sel bakteri.

# BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

## 5.1. Kesimpulan

1. Mikroba yang berhasil diisolasi dari teh kombucha berasal dari enis kapang, khamir dan bakteri. Bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi dari teh kombucha berumah 31 isolat.
2. Berdasarkan sifat morfologis, fisik dan biokimianya, bakteri asam laktat yang berhasil diisolasi memiliki sifat katalase negatif, Gram positif, bentuk batang dan bulat.
3. Berdasarkan sifat ketahanannya terhadap pH rendah dan garam empedu, bakteri asam laktat memiliki ketahanan yang cukup tinggi terhadap pH rendah bahkan menunjukkan peningkatan populasi pada media yang mengandung garam empedu 0,5%.

## 5.2. Saran

Perlu dilakukan uji lebih lanjut tentang sifat-sifat probiotik bakteri asam laktat untuk mendapatkan bakteri asam laktat unggul kandidat probiotik yang berhasil diisolasi dari the kombucha.

## DAFTAR PUSTAKA


Anonimous. 2008. Probiotik, Yoghurt dan Manfaatnya dalam Menjaga Keseimbangan flora normal pencernaan. http://dwiyathi.wordpress.com. Diakses tanggal 07 Agustus 2008.

Anonimous. 2012a. Kombucha. http://id.wikipedia.org/wiki/Kombucha. Diakses tanggal 10 Februari 2012.

Anonimous. 2012b. Kombucha - Healthy Beverage and Natural Remedy from teh Far East. http://www.kombu.de/anl-ind.htm

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International. Sixteenth Edition, 5th Revision, 1999. Vol. 2.USA : AOAC Inc.

Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In*: Salminen,S., dan A. Wright, editor. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspect. 3rd edition. Marcel Dekker Inc., New York. Page 1-66.

Bridson, E.Y. 1998. *The Oxoid Manual.* 8th. Ed. Basingstoke: Unipath Limited. p. 3-16.

Chou LS, Weimer B. 1999. Isolation and Characterization of Acid and Bile Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. J Dairy Sci 82:23-31.

FAO/WHO Experts' Report. 2001. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Bacteria.

Fardiaz S. 1989. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Lembaga Sumberdaya Informasi, IPB. Bogor.

Fuller R. 1989. Probiotics in Man and Animals. J Appl Bacteriol 66:365-378.

Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. PT. Gramedia. Jakarta.

Harrigan, W.F., Mc Chance M.E. 1998. Laboratory Methods in Food Microbiology 3rd edition. Academic Press, Inc., New York.

Hayakawa,K. 1992. Classification and Action of Food Microorganism. Di dalam: Nakazawa, Y. dan A. Hosono (eds). Function of Fermented Milk: Challenges for teh health science, p 127. Elsevier Science Publisher Ltd.

Lay, B.W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Cetakan I. Jakarta: PT. Raja Grafindo Persada. hal. 13-89.

Naland, H. 2004. Kombucha: Teh Ajaib Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit. Penerbit Agromedia Pustaka. Jakarta.

Ngatirah, Harmayani E, Rahayu ES, Tyas Utami. 2000. Seleksi Bakteri Asam Laktat sebagai Agensia Probiotik yang Berpotensi Menurunkan Kolesterol. Seminar Nasional Industri Pangan. PATPI. 2000. Surabaya 10 – 11 Oktober 2000.

Nuraida,L. 1988. Studies on Microorganisms Isolated from Pozol, a Mexican Fermented Maize Dough. Faculty of Agriculture and Food Departement of Food Science and Technology. University of Reading.

Nurani, D. 2002. Kajian Proses Pembekuan dan Daya Simpan Kultur Bakteri Asam Laktat Asal Dadih untuk Produksi Kultur Starter [tesis]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Pelczar, M.J dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi 2. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

Pessi T, Sutas Y, Marttinen A, Isolauri E. 1998. Probiotics Reinforce Mucosal Degradation of Antigens in Rats : Implications for Tehrapeutic Use of Probiotics. J Nutrition 128:2313-2318.

Pot B, Ludwig W, Kersters, Schleifer K. 1994. Taxonomy Lactic Acid Bacteria di dalam: De Vuyst, L. dan EJ. Vandamme. Bacteriosins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application. London: Blackie Academic and Professional.

Salminen, S. dan Atte von Wright. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd edition. Revised and Expanded. Marcel Dekker, inc., New York.

Shortt C. 1999. Teh Probiotic Century: Historical and Current Perspectives. Review Trends Food Science and Tech. 10:411-417.

Siegumfeldt, H., Rechninger, B.K., Jacobsen, M. 2000. Dynamic Changes of Intracelluler pH in Individual Lactic Acid Bacterium Cells in Response to a Rapid Drop in Extracellular pH. Applied and Environmental Microbiology. 66: 2330 – 2335.

Smet ID, L van Hoorde, MV Woestyne, H Christiaens dan W Verstraete. 1995. Significance of Bile Salt Hydrolityc Activities of *Lactobacilli*. J.Appl Bacteriol 79:292-301.

Surono, I.S., 1998. Peranan Bakteri Asam Laktat Asal Indonesia sebagai Antimutagen. Majalah Ilmiah: Widya, Feb. 1998/No 149, th XV, hal 55 – 59.

Surono, I.S. 2004. Probiotik. Susu Fermentasi dan Kesehatan. Penerbit PT. Tri Cipta Karya (TRICK).

Widiada, I.G.N. 2006. "Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenous dari Susu Kuda Liar Bima Selama Penyimpanan dan Aktivitas Antibakterinya" (*tesis*). Denpasar: Universitas Udayana.

# Potensi Bakteri Asam Laktat Kandidat Probiotik Yang Diisolasi Dari Minuman Fungsional Teh Kombucha

ORIGINALITY REPORT

| 13% | 12% | 5% | 4% |
|---|---|---|---|
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

MATCHED SOURCE

| | | |
|---|---|---|
| 1 | pps.unud.ac.id<br>Internet Source | 1% |

1%

★ pps.unud.ac.id

Internet Source

| | | | |
|---|---|---|---|
| EXCLUDE QUOTES | OFF | EXCLUDE MATCHES | OFF |
| EXCLUDE BIBLIOGRAPHY | OFF | | |