

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Analisa Karakteristik Bahan Baku

Bahan baku yang digunakan dalam pembuatan kombucha yaitu salak Suwaru yang didapatkan dari Desa Suwaru, Kecamatan Gondanglegi, Kabupaten Malang. Buah yang digunakan dalam penelitian ini dibeli dari petani salak Suwaru secara langsung. Pembelian buah dilakukan pada hari yang sama dengan hari pembuatan kombucha salak Suwaru. Hal ini dilakukan untuk menjaga kesegaran bahan baku yang akan dipakai dalam proses pembuatan kombucha. Perbedaan varietas buah salak serta waktu panen mempengaruhi kandungan kimia pada buah salak. Oleh karena itu perlu dilakukan analisa bahan baku sebelum dilakukan fermentasi untuk mengetahui karakteristik kimia bahan baku yang digunakan. Analisa yang dilakukan meliputi total asam, total gula, total fenol, dan kadar air. Hasil analisa salak Suwaru kemudian dibandingkan dengan karakteristik salak Pondoh yang ditunjukkan pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4.1** Hasil Analisa Kandungan Kimia Buah Salak Suwaru Dibandingkan dengan Salak Pondoh

Parameter	Salak Suwaru	Salak Pondoh*
Total Asam (%)	1,58 ± 0,015	1,84
Total Gula (%)	8,75 ± 0,031	7,74
Total Fenol (mg/L)	643,33 ± 2,464	460,00
Kadar Air (%)	81,64 ± 0,342	81,16

Keterangan: \*Hidayati (2013)

Hasil analisa menunjukkan total asam salak Suwaru lebih rendah dibandingkan total asam salak Pondoh, yaitu sebesar 1,58%. Total asam pada salak Suwaru diduga berasal dari asam organik. Menurut Zubaidah (2010), keasaman buah ditentukan oleh kandungan asam organik. Menurut Garman dan Sherrington (1989), asam organik pada buah-buahan merupakan jenis asam lemah. Selain itu, waktu panen buah salak juga berpengaruh terhadap kandungan total asamnya. Menurut Apandi (1984), kadar asam organik dalam kebanyakan buah akan berkurang perlahan-lahan selama pematangan.

Hasil analisa menunjukkan total gula pada salak Suwaru lebih tinggi dibandingkan dengan total gula pada salak Pondoh, yaitu sebesar 8,75%. Menurut Hartanto *et al.* (2000), kandungan gula terbanyak yang ada dalam buah salak adalah sukrosa, kemudian diikuti glukosa dan fruktosa. Namun kadar gula

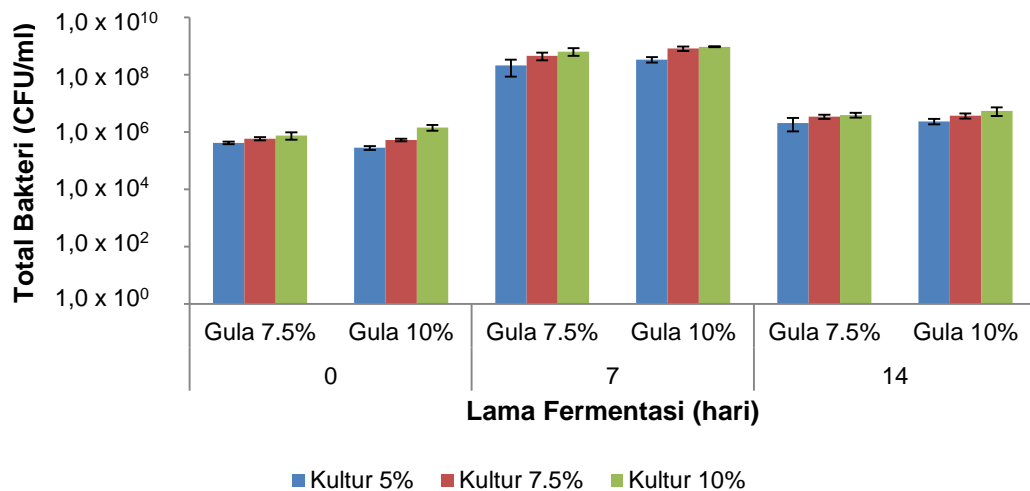
tersebut masih rendah untuk fermentasi, sehingga perlu penambahan gula hingga kebutuhan gula tercukupi. Menurut Aditiwati dan Kusnadi (2003), proses pembuatan kombucha memerlukan penambahan gula sekitar 10% (b/v) supaya mikroorganisme dapat tumbuh secara optimal. Selain gula, kadar air buah salak juga berperan dalam mendukung pertumbuhan kultur kombucha dan berpengaruh terhadap jumlah sari salak yang dihasilkan untuk pembuatan kombucha. Hasil analisa kadar air menunjukkan salak Suwaru dan salak Pondoh memiliki kadar air yang hampir sama, yaitu 81,64% dan 81,16%.

Hasil analisa menunjukkan bahwa total fenol salak Suwaru lebih tinggi dari salak Pondoh. Total fenol pada salak Suwaru sebesar 643,3 mg/L sedangkan pada salak Pondoh sebesar 460 mg/L. Menurut Priyatno *et al.* (2006), senyawa fenolik yang terkandung dalam buah salak yaitu flavonoid, tanin, dan katekin. Senyawa fenolik pada buah salak dapat berperan sebagai antibakteri. Menurut Nurina *et al.* (2014), kandungan flavonoid dan tanin pada ekstrak buah salak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

## **4.2 Analisa Karakteristik Kombucha Salak Suwaru**

### **4.2.1 Total Bakteri**

Rerata total bakteri pada kombucha salak Suwaru dengan berbagai konsentrasi gula dan kultur berkisar antara  $2,8 \times 10^5$  CFU/ml hingga  $1,4 \times 10^6$  CFU/ml pada hari fermentasi ke 0. Pada hari ke 7 rerata total bakteri berkisar antara  $2,1 \times 10^8$  CFU/ml hingga  $9,4 \times 10^8$  CFU/ml. Pada hari ke 14 rerata total bakteri berkisar antara  $2,1 \times 10^6$  CFU/ml hingga  $5,5 \times 10^6$  CFU/ml. Perubahan nilai total bakteri pada kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.1**.



**Gambar 4.1** Grafik Rerata Total Bakteri Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.1** menunjukkan terjadi peningkatan total bakteri pada kombucha salak Suwaru dari hari ke 0 hingga hari ke 7, setelah hari ke 7 total bakteri mengalami penurunan hingga hari ke 14. Semakin tinggi konsentrasi gula dan kultur, maka total bakteri dari kombucha salak Suwaru cenderung meningkat. Rerata peningkatan total bakteri pada kombucha salak Suwaru akibat variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.2**.

**Tabel 4.2** Rerata Total Bakteri Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula dan Kultur

Konsentrasi Gula (%)	Konsentrasi Kultur (%)	Total Bakteri (CFU/ml)			
		Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan
7,5	5	$4,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^8$	$2,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
	7,5	$5,8 \times 10^5$	$4,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
	10	$7,6 \times 10^5$	$6,4 \times 10^8$	$3,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
10	5	$2,8 \times 10^5$	$3,4 \times 10^8$	$2,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
	7,5	$5,3 \times 10^5$	$8,2 \times 10^8$	$3,7 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
	10	$1,4 \times 10^6$	$9,4 \times 10^8$	$5,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$

Keterangan: Data yang diperoleh merupakan rata-rata dari 3 ulangan

Pada **Tabel 4.2** dapat diketahui peningkatan total bakteri dari kombucha salak Suwaru dari hari fermentasi ke-0 hingga hari fermentasi ke-7 cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Hal tersebut diduga karena bakteri dari kultur memanfaatkan nutrisi yang terdapat pada substrat sari salak Suwaru dan gula untuk proses metabolisme dan pertumbuhannya. Menurut Frank (1995), bakteri asam asetat yang terdapat pada kombucha memanfaatkan glukosa dan alkohol sebagai sumber nutrisinya.

Peningkatan total bakteri selama fermentasi disebabkan karena selama proses fermentasi, bakteri memanfaatkan etanol yang dihasilkan oleh khamir sebagai sumber nutrisi selama fermentasi, selain itu bakteri juga memanfaatkan glukosa sebagai sumber nutrisi yang nantinya akan dirombak menjadi asam glukonat (Chen dan Liu, 2000).

Sel bakteri mengalami penurunan pada hari ke 7 hingga hari ke 14. Hal tersebut disebabkan karena kemampuan bakteri merombak gula menurun akibat dihasilkannya berbagai senyawa metabolit hasil fermentasi dan nutrisi yang terdapat dalam kombucha mulai berkurang. Semakin lama waktu fermentasi kombucha, maka asam-asam organik yang dihasilkan semakin tinggi, sehingga mampu menghambat pertumbuhan sel bakteri dan jumlah bakteri mengalami penurunan. Menurut Chen dan Liu (2000) pH optimum untuk pertumbuhan *Acetobacter sp.* yaitu antara 5,4 hingga 6,3. Bakteri yang tumbuh dan berperan dalam proses fermentasi kombucha sebagian besar adalah jenis bakteri penghasil asam asetat dan asam-asam organik lainnya. Menurut penelitian Marsh *et al.* (2014), bakteri utama yang terdapat pada kombucha yaitu *Gluconacetobacter* sebanyak >85%. Disamping itu juga terdapat bakteri jenis *Acetobacter* dan *Lactobacillus*. *Gluconacetobacter* dan *Acetobacter* berperan dalam mengubah alkohol menjadi asam asetat, sedangkan *Lactobacillus* berperan dalam pembentukan asam laktat. Ketiga jenis bakteri tersebut mengalami peningkatan pada rentang hari ke 3 hingga hari ke 10.

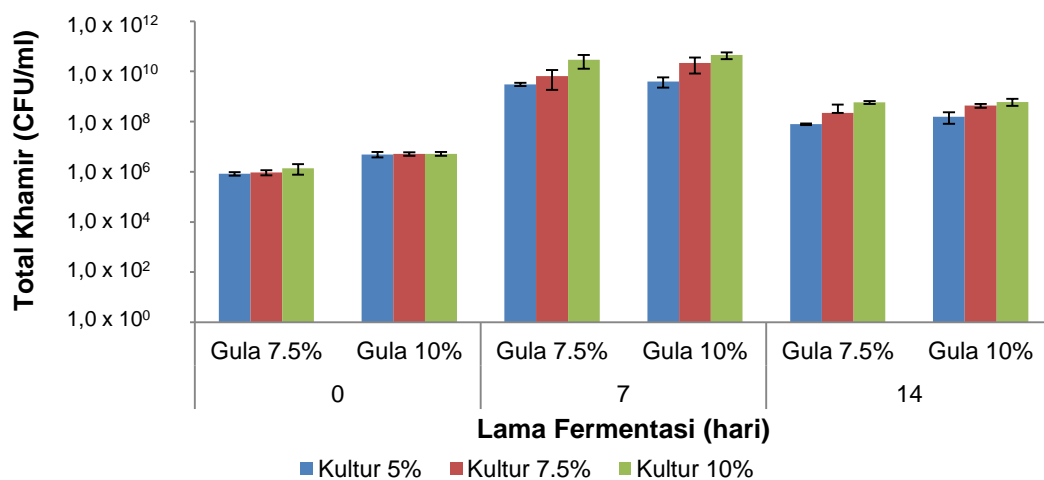
Kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 10% cenderung mengalami peningkatan total bakteri lebih tinggi jika dibandingkan dengan kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 7,5%, sehingga dapat diartikan semakin tinggi konsentrasi gula yang ditambahkan, maka semakin tinggi nilai peningkatan total bakteri. Gula yang ditambahkan diduga berperan sebagai sumber glukosa yang digunakan bakteri untuk pertumbuhannya. Menurut Frank (1995), glukosa dan alkohol diperoleh melalui fermentasi khamir dalam memecah sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa, yang kemudian diubah menjadi karbon dioksida dan alkohol. Glukosa juga merupakan sumber karbon yang dapat dioksidasi oleh *Gluconobacter* menjadi asam glukonat (Stasiak dan Stanisław, 2009). Menurut Goh *et al.* (2012), sumber karbon dengan konsentrasi yang sesuai akan mendukung pertumbuhan sel khamir, sehingga sel khamir dapat menghasilkan metabolit yang dapat digunakan oleh bakteri asam asetat. Namun konsentrasi gula yang berlebihan dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Menurut Caldwell (2000), jumlah nutrisi yang berlebihan berdampak pada terjadinya akumulasi senyawa penghambat, sehingga menyebabkan pertumbuhan bakteri dan khamir menjadi terhambat.

Konsentrasi kultur yang ditambahkan juga mendukung peningkatan total bakteri, semakin tinggi konsentrasi kultur yang ditambahkan, maka semakin tinggi peningkatan total bakteri. Nilai total bakteri mengalami peningkatan terbesar pada konsentrasi kultur 10%. Hal ini diduga karena kultur kombucha dengan konsentrasi besar mampu lebih mudah beradaptasi dibandingkan dengan kultur dengan konsentrasi kecil, sehingga pertumbuhan bakteri dapat berlangsung lebih cepat. Menurut penelitian Marwati *et al.* (2013), penambahan starter kultur dengan konsentrasi 30% menunjukkan jumlah total mikroba tertinggi jika dibandingkan dengan penambahan starter dengan konsentrasi 10% dan 20%.

#### 4.2.2 Total Khamir

Rerata total khamir pada kombucha salak Suwaru dengan berbagai konsentrasi gula dan kultur berkisar antara  $8,4 \times 10^5$  CFU/ml hingga  $5,2 \times 10^6$  CFU/ml pada hari fermentasi ke 0. Pada hari ke 7 rerata total khamir berkisar antara  $3,1 \times 10^9$  CFU/ml hingga  $4,5 \times 10^{10}$  CFU/ml. Pada hari ke 14 rerata total khamir berkisar antara  $7,8 \times 10^7$  CFU/ml hingga  $6,1 \times 10^8$  CFU/ml. Perubahan nilai total khamir pada kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.2**.



**Gambar 4.2** Grafik Rerata Total Khamir Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.2** menunjukkan terjadi peningkatan total khamir pada kombucha salak Suwaru dari hari ke 0 hingga hari ke 7, setelah hari ke 7 total khamir mengalami penurunan hingga hari ke 14. Semakin tinggi konsentrasi gula dan kultur, maka total khamir dari kombucha salak Suwaru cenderung meningkat. Rerata peningkatan total khamir pada kombucha salak Suwaru akibat variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.3**.

**Tabel 4.3** Rerata Total Khamir Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula dan Kultur

Konsentrasi Gula (%)	Konsentrasi Kultur (%)	Total Khamir (CFU/ml)			
		Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan
7,5	5	$8,4 \times 10^5$	$3,1 \times 10^9$	$7,8 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$
	7,5	$9,5 \times 10^5$	$6,6 \times 10^9$	$2,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$
	10	$1,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^8$	$5,8 \times 10^8$
10	5	$4,9 \times 10^6$	$4,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
	7,5	$5,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$
	10	$5,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^{10}$	$6,1 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$

Keterangan: Data yang diperoleh merupakan rata-rata dari 3 ulangan

Pada **Tabel 4.3** dapat diketahui peningkatan total khamir dari kombucha salak Suwaru dari hari fermentasi ke-0 hingga hari fermentasi ke-7 cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Hal tersebut diduga karena khamir dari kultur memanfaatkan nutrisi yang terdapat pada substrat sari salak Suwaru dan gula untuk proses metabolisme dan pertumbuhannya. Khamir memanfaatkan sumber karbon berupa gula untuk difermentasi menjadi komponen yang lebih sederhana secara anaerob. Hal ini sesuai dengan Nainggolan (2009), yang menyatakan bahwa khamir pada kombucha memerlukan waktu untuk fase adaptasi sampai hari ke-6, kemudian pertumbuhan meningkat (fase logaritmik) sampai pada hari ke-10. Menurut Chen dan Liu (2000), jumlah khamir dapat meningkat secara konsisten pada lingkungan hidup yang sesuai, dengan jumlah sumber karbon yang optimal, dan bebas dari akumulasi toksik. Jika dibandingkan dengan pertumbuhan bakteri, pertumbuhan khamir pada fermentasi kombucha salak Suwaru cenderung lebih tinggi dan lebih cepat. Menurut Goh *et al.* (2012), konsentrasi sel khamir secara umum lebih tinggi dibandingkan bakteri asam asetat, dan pertumbuhan khamir lebih cepat dibandingkan pertumbuhan bakteri asam asetat. Khamir menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa pada permulaan fermentasi, yang kemudian dimanfaatkan untuk menghasilkan etanol dan karbon dioksida. Menurut Frank (1995), aktivitas metabolisme bakteri asam asetat lebih

rendah dibandingkan khamir disebabkan karena nutrisi yang dapat dimanfaatkan bakteri berupa glukosa dan alkohol merupakan metabolit yang harus diproduksi sel khamir terlebih dahulu.

Sel khamir mengalami penurunan pada hari ke 7 hingga hari ke 14. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Teoh (2004), jumlah khamir mengalami pertumbuhan tertinggi pada rentang hari ke 6 dan 8, kemudian jumlah sel khamir mengalami penurunan. Menurut Jayabalan *et al.* (2007), penurunan jumlah khamir setelah hari ke 9 disebabkan karena penurunan pH selama fermentasi (*acid shock*), sehingga mampu menghambat pertumbuhan khamir dan bakteri. Menurut Chen dan Liu (2000), penurunan total khamir juga dipengaruhi oleh terbentuknya karbon dioksida yang terakumulasi diantara pelikel dan substrat cair selama fermentasi alkohol oleh khamir, sehingga menyebabkan transfer oksigen dari permukaan ke substrat cair semakin menurun dan pertumbuhan khamir dan bakteri menjadi terhambat. Khamir yang tumbuh dan berperan dalam fermentasi kombucha terdiri dari beberapa jenis khamir. Menurut penelitian Teoh *et al.* (2004), jumlah dan jenis khamir yang terdapat pada kombucha sangat beragam, antara lain *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspota delbrueckii* dan *Zygosaccharomyces bailii*.

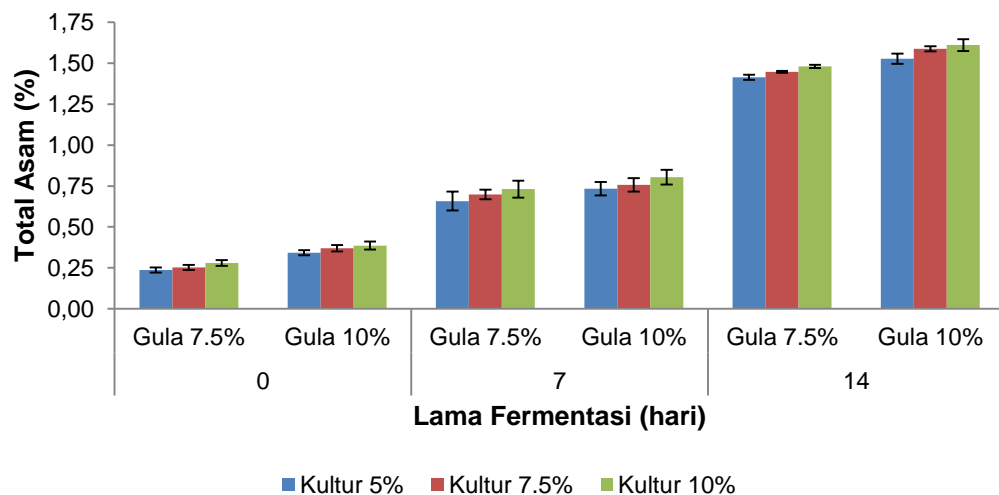
Kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 10% cenderung mengalami peningkatan total khamir lebih tinggi dibandingkan dengan kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 7,5%, sehingga dapat diartikan semakin tinggi konsentrasi gula yang ditambahkan, maka semakin tinggi nilai peningkatan total khamir. Gula yang ditambahkan diduga berperan sebagai substrat yang digunakan untuk mendukung pertumbuhan khamir. Khamir berperan dalam mengubah sukrosa menjadi alkohol melalui fermentasi anaerob. Menurut Reiss (1994) khamir berperan dalam menghidrolisis sukrosa dan fruktosa yang kemudian menghasilkan etanol dan karbon dioksida. Menurut Goh *et al.* (2012), sumber karbon yang terdapat pada gula dengan konsentrasi yang sesuai akan mendukung regenerasi sel pada khamir, sehingga jika dibandingkan dengan hasil penelitian maka penambahan gula dengan konsentrasi 10% lebih sesuai untuk regenerasi sel khamir jika dibandingkan dengan konsentrasi gula 7,5%.

Peningkatan khamir juga dipengaruhi oleh konsentrasi kultur. Nilai total khamir mengalami peningkatan terbesar pada konsentrasi kultur 10%. Hal ini diduga karena kultur kombucha dengan konsentrasi besar mampu lebih mudah

beradaptasi dibandingkan dengan kultur dengan konsentrasi kecil, sehingga pertumbuhannya dapat berlangsung lebih cepat. Menurut penelitian Marwati *et al.* (2013), perbedaan starter kultur yang ditambahkan memberi pengaruh terhadap total khamir pada produk kombucha.

#### 4.2.3 Total Asam

Rerata total asam kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 0,24% hingga 0,39% pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata total asam berkisar antara 0,69% hingga 0,80%. Pada hari ke 14, rerata total asam berkisar antara 1,41% hingga 1,61%. Perubahan nilai total asam kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.3**.



**Gambar 4.3** Grafik Rerata Total Asam Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.3** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka total asam yang dihasilkan oleh kombucha salak Suwaru cenderung meningkat. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi gula dan konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan total asam pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan total asam kombucha salak Suwaru akibat penambahan gula dapat dilihat pada **Tabel 4.4**.



**Tabel 4.4** Rerata Total Asam Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula (%)	Total Asam (%)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
7,5	0,26 ± 0,02	0,70 ± 0,05	1,45 ± 0,03	1,19 ± 0,02a	0,02
10	0,37 ± 0,03	0,76 ± 0,05	1,57 ± 0,04	1,21 ± 0,02b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.4** menunjukkan total asam mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan total asam disebabkan karena bakteri yang tumbuh dalam fermentasi kombucha salak Suwaru mengubah etanol dan glukosa menjadi asam-asam organik melalui fermentasi secara aerob. Menurut Frank (1995), glukosa yang terdapat pada medium fermentasi dirombak menjadi etil alkohol oleh khamir. Selanjutnya, etil alkohol yang dihasilkan akan bereaksi dengan oksigen membentuk asam asetat dan asam-asam organik lainnya. Aktivitas biokimia yang kedua adalah dirombaknya glukosa menjadi asam glukonat oleh bakteri *Acetobacter* (Bisson, 2001). Menurut Kaczmarczyk dan Lochyński (2014), kombucha mengandung berbagai jenis asam organik antara lain asam asetat, asam laktat, asam glukonat, dan asam glukuronat. Menurut penelitian Jayabalan *et al.* (2007), asam organik yang dominan pada kombucha adalah asam asetat dengan konsentrasi 2,3 g/l hingga 9,5 g/l. Selama fermentasi, asam asetat mengalami peningkatan dan mencapai jumlah maksimum pada hari fermentasi ke 12 hingga hari ke 15.

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan total asam seiring dengan peningkatan konsentrasi gula. Kombucha dengan konsentrasi gula 10% menunjukkan peningkatan total asam yang tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 7,5% menunjukkan peningkatan total asam yang terendah. Menurut Jayabalan *et al.* (2007), sukrosa dimetabolisme menjadi asam-asam organik oleh bakteri dan khamir, yang kemudian meningkatkan total asam pada kombucha. Jumlah sukrosa yang semakin tinggi dapat menghasilkan asam-asam organik yang lebih tinggi melalui hasil fermentasi. Menurut Frank (1995), gula (sukrosa) merupakan sumber energi dimana sukrosa akan dikonversi menjadi glukosa yang digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan sel bakteri dan pembentukan asam asetat.

Sedangkan peningkatan total asam kombucha salak Suwaru akibat penambahan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.5**.

**Tabel 4.5** Rerata Total Asam Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

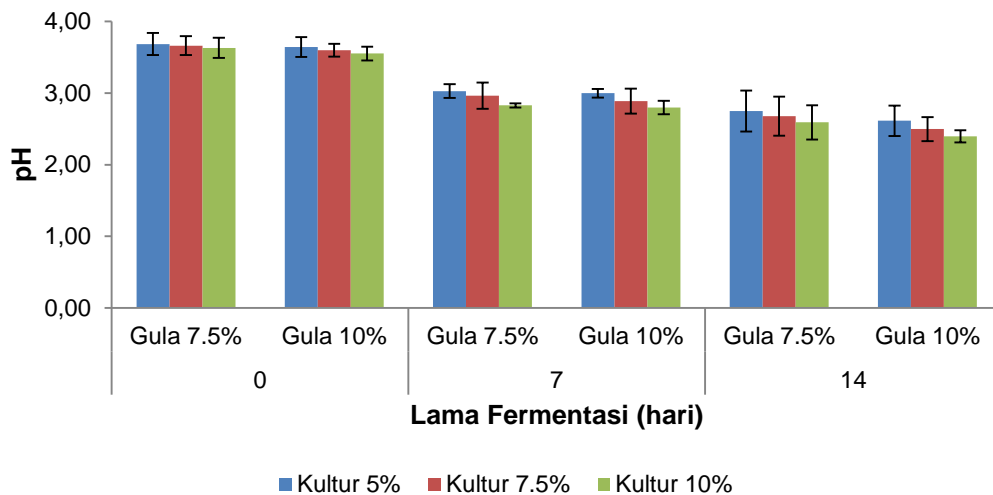
Konsentrasi Kultur (%)	Total Asam (%)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
5	0,29 ± 0,06	0,70 ± 0,06	1,47 ± 0,07	1,18 ± 0,02a	0,02
7,5	0,31 ± 0,07	0,73 ± 0,05	1,52 ± 0,08	1,21 ± 0,02b	
10	0,33 ± 0,06	0,77 ± 0,06	1,55 ± 0,08	1,21 ± 0,02b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.5** menunjukkan semakin tinggi konsentrasi kultur kombucha yang ditambahkan, maka semakin tinggi peningkatan total asam pada kombucha salak Suwaru. Kombucha dengan konsentrasi kultur 10% menunjukkan peningkatan total asam yang tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 5% menunjukkan peningkatan total asam yang terendah. Hal ini diduga karena jumlah sel khamir dan bakteri yang tinggi pada kombucha dapat meningkatkan aktivitas pemecahan substrat berupa sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, yang kemudian dimanfaatkan untuk diubah menjadi asam-asam organik oleh bakteri. Menurut Marwati *et al.* (2013), asam yang terbentuk pada kombucha merupakan hasil metabolit mikroorganisme selama fermentasi. Hal tersebut diperkuat oleh pernyataan Nainggolan (2009), yang menyatakan bahwa selama fermentasi, kombucha akan mengalami peningkatan asam-asam organik yang tinggi akibat adanya aktivitas mikroba.

#### 4.2.4 pH

Rerata pH kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 3,55 hingga 3,68 pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata pH berkisar antara 2,80 hingga 3,03. Pada hari ke 14, rerata pH berkisar antara 2,40 hingga 2,75. Perubahan nilai pH kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.4**.



**Gambar 4.4** Grafik Rerata pH Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.4** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai pH kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi gula dan konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan pH pada kombucha salak Suwaru. Rerata penurunan pH kombucha salak Suwaru akibat penambahan gula dapat dilihat pada **Tabel 4.6**.

**Tabel 4.6** Rerata pH Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula (%)	pH				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Penurunan	
7,5	3,66 ± 0,13	2,94 ± 0,14	2,67 ± 0,24	0,99 ± 0,14a	0,06
10	3,60 ± 0,10	2,89 ± 0,14	2,50 ± 0,17	1,09 ± 0,12b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.6** menunjukkan pH kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Penurunan pH diduga disebabkan karena terjadinya akumulasi asam organik hasil metabolisme mikroorganisme selama fermentasi. Menurut Chakravorty *et al.* (2016), penurunan pH dipengaruhi oleh asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi. Asam organik yang dominan ditemukan pada kombucha

adalah asam asetat dan asam glukonat. Asam asetat yang terlarut akan melepaskan proton-proton bebas ( $H^+$ ) yang menyebabkan penurunan pH larutan (Wistiana dan Zubaidah, 2015). Nilai pH kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan yang signifikan dari hari fermentasi ke 0 hingga 7, dan cenderung mengalami penurunan yang relatif sedikit dari hari fermentasi ke 7 hingga 14. Hal tersebut diduga disebabkan oleh terbentuknya efek buffer selama fermentasi akibat interaksi antara asam-asam organik dengan mineral yang terkandung dalam sari salak Suwaru. Menurut Malbasa *et al.* (2011), penurunan pH kombucha berlangsung secara signifikan hingga hari ke 3, kemudian penurunan pH menjadi lebih lambat hingga akhir waktu fermentasi. Hal tersebut disebabkan karena terbentuknya efek buffer akibat interaksi antara asam-asam organik dengan mineral yang berasal dari substrat, sehingga nilai pH cenderung tidak banyak perubahan.

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami penurunan pH seiring dengan peningkatan konsentrasi gula. Kombucha dengan konsentrasi gula 10% menunjukkan penurunan pH yang tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 7,5% menunjukkan penurunan pH yang terendah. Hal ini diduga karena gula menjadi substrat utama untuk diubah oleh mikroorganisme selama fermentasi menjadi asam-asam organik, yang berperan dalam menurunkan pH. Menurut Greenwalt *et al.* (1998), adanya aktivitas bakteri dapat membentuk asam-asam yang menyebabkan pH turun. Rendahnya nilai pH larutan tergantung pada kadar gula yang terkandung pada larutan sebagai sumber karbon mikroba sehingga penurunan nilai pH dapat mempengaruhi kondisi pertumbuhan bakteri dan khamir pada larutan. Besarnya konsentrasi gula yang diberikan juga mempengaruhi glukosa yang diubah menjadi asam glukonat. Menurut Hwang *et al.* (1999), perubahan glukosa menjadi asam glukonat selama fermentasi memberikan dampak yang signifikan terhadap penurunan pH.

Sedangkan penurunan pH kombucha salak Suwaru akibat penambahan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.7**.

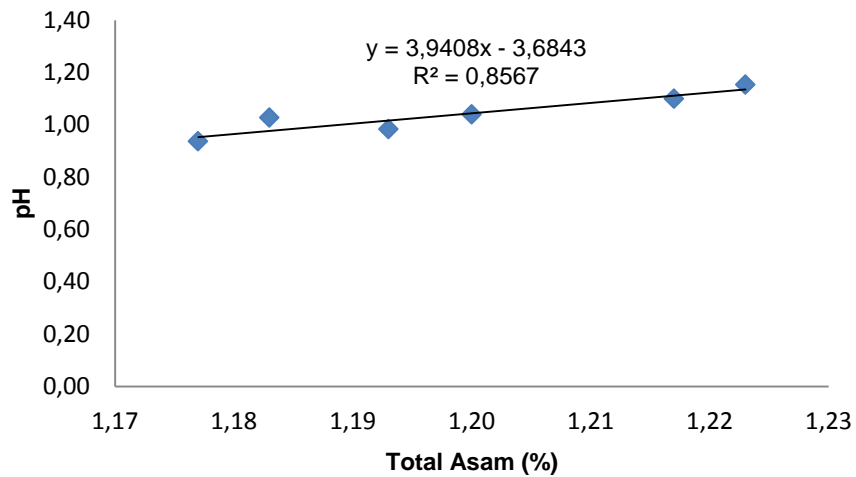
**Tabel 4.7** Rerata pH Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	pH				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Penurunan	
5	3,66 ± 0,13	3,01 ± 0,07	2,68 ± 0,24	0,98 ± 0,14a	0,08
7,5	3,63 ± 0,11	2,93 ± 0,17	2,59 ± 0,22	1,04 ± 0,14a	
10	3,59 ± 0,12	2,81 ± 0,06	2,49 ± 0,19	1,10 ± 0,12b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.7** menunjukkan semakin tinggi konsentrasi kultur kombucha yang ditambahkan, maka semakin tinggi penurunan pH pada kombucha salak Suwaru. Kombucha dengan konsentrasi kultur 10% menunjukkan penurunan pH yang tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 5% menunjukkan penurunan pH yang terendah. Hal ini diduga karena jumlah sel khamir dan bakteri yang tinggi pada kombucha dapat meningkatkan produksi asam-asam organik selama fermentasi. Asam-asam organik yang dihasilkan berpengaruh terhadap penurunan pH. Menurut Júnior *et al.* (2009), selama awal proses fermentasi, penurunan pH disebabkan oleh bakteri dan khamir yang mengubah sukrosa menjadi asam organik. Penurunan nilai pH dalam fermentasi juga mendukung kehidupan bakteri *Acetobacter xylinum* dalam kultur kombucha untuk melangsungkan aktivitas metabolismenya (Fardiaz, 1988). Menurut penelitian Goh *et al.* (2012), bakteri asam asetat pada kombucha dapat tumbuh dan membentuk selulosa pada pH dibawah 3,0.

Dari hasil analisis tersebut, dilakukan penentuan model matematika hubungan antara peningkatan total asam dengan penurunan pH kombucha salak Suwaru. Hasil analisis dari dua parameter tersebut saling dihubungkan sehingga didapat model hubungan persamaannya. Grafik korelasi total asam dan pH kombucha salak Suwaru dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.

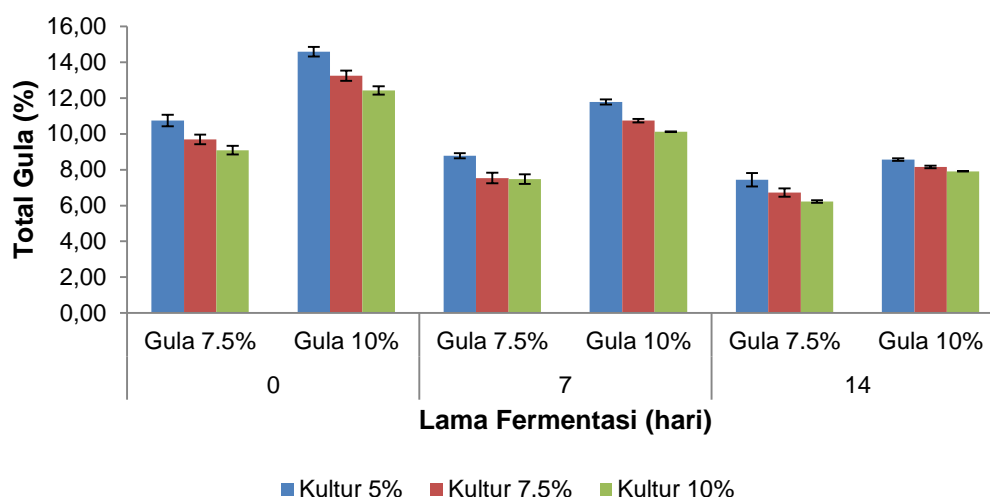


**Gambar 4.5** Grafik Korelasi Hubungan Peningkatan Total Asam dan Penurunan pH Kombucha Salak Suwaru

**Gambar 4.5** menunjukkan bahwa terjadi korelasi positif antara peningkatan total asam dan penurunan pH yang berarti semakin tinggi nilai peningkatan total asam, maka penurunan pH akan semakin tinggi. Persamaan korelasi  $Y = 3,9408x - 3,6843$  dengan koefisien determinasi  $R^2 = 0,8567$  menunjukkan nilai korelasi kuat. Analisis pH bergantung pada jumlah atom  $H^+$  bebas yang terdapat pada media fermentasi, sedangkan nilai total asam diperoleh dari akumulasi asam-asam organik yang terbentuk selama fermentasi (Wagner *et al.*, 2013). Diduga selama fermentasi kombucha salak Suwaru, asam-asam organik yang terbentuk melepaskan ion  $H^+$  yang berperan dalam menurunkan nilai pH selama fermentasi.

#### 4.2.5 Total Gula

Rerata total gula kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 9,09% hingga 14,58% pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata total gula berkisar antara 7,47% hingga 11,78%. Pada hari ke 14, rerata total gula berkisar antara 6,22% hingga 8,56%. Perubahan total gula kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.6**.



**Gambar 4.6** Grafik Rerata Total Gula Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.6** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai total gula kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi gula dan konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan total gula pada kombucha salak suwaru. Rerata penurunan total gula kombucha salak Suwaru akibat penambahan gula dapat dilihat pada **Tabel 4.8**.

**Tabel 4.8** Rerata Total Gula Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula (%)	Total Gula (%)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Penurunan	
7,5	9,84 ± 0,77	7,93 ± 0,67	6,80 ± 0,58	3,05 ± 0,48a	0,53
10	13,41 ± 0,97	10,88 ± 0,73	8,21 ± 0,29	5,20 ± 0,70b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.8** menunjukkan total gula kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Penurunan total gula diduga disebabkan karena adanya aktivitas khamir dan bakteri yang memanfaatkan gula pereduksi sebagai sumber karbon untuk mendukung pertumbuhannya dan untuk diubah menjadi alkohol, asam-asam organik dan zat metabolit lainnya. Menurut Dufresne dan Farnworth (2000),

khamir berperan dalam mengubah glukosa menjadi alkohol, sedangkan bakteri *Acetobacter* berperan dalam mengoksidasi glukosa menjadi asam glukonat. Bakteri *Acetobacter* juga mampu mensintesis glukosa menjadi polisakarida atau selulosa (Aditiwati dan Kusnadi, 2003). Glukosa pada substrat difermentasi secara anaerob oleh khamir dan menghasilkan etanol dan CO<sub>2</sub> (Wood, 1998).

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami penurunan total gula seiring dengan peningkatan konsentrasi gula. Kombucha dengan konsentrasi gula 10% menunjukkan penurunan total gula tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 7,5% menunjukkan penurunan total gula terendah. Hal ini diduga disebabkan karena jumlah sukrosa yang tinggi pada substrat sari salak Suwaru dapat dimanfaatkan dengan baik oleh khamir dan bakteri dalam proses fermentasi, sehingga jumlah gula pereduksi pada substrat cepat menurun. Hasil ini sesuai dengan penelitian Malbasa *et al.* (2011), dimana kombucha molasses dengan konsentrasi gula tertinggi (70 g/l) menunjukkan tingkat penggunaan sukrosa tertinggi yakni sebesar 97%, jika dibandingkan dengan kombucha dengan konsentrasi 50 g/l dan 35 g/l. Menurut penelitian Chakravorty *et al.* (2016), pada 7 hari pertama fermentasi kombucha terjadi pemecahan sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa secara signifikan, oleh enzim invertase dari khamir. Glukosa yang dihasilkan, kemudian digunakan oleh khamir untuk menghasilkan etanol dan karbon dioksida, sedangkan fruktosa tetap menjadi bagian dari larutan fermentasi dan digunakan oleh mikroba dalam jumlah yang lebih sedikit (Greenwalt *et al.*, 1998).

Sedangkan penurunan total gula kombucha salak Suwaru akibat penambahan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.9**.

**Tabel 4.9** Rerata Total Gula Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	Total Gula (%)			Penurunan	BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14		
5	12,66 ± 2,11	10,28 ± 1,65	8,00 ± 0,66	4,66 ± 1,55b	0,65
7,5	11,46 ± 1,96	9,13 ± 1,77	7,44 ± 0,80	4,02 ± 1,21a	
10	10,76 ± 1,84	8,80 ± 1,46	7,07 ± 0,93	3,69 ± 0,93a	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

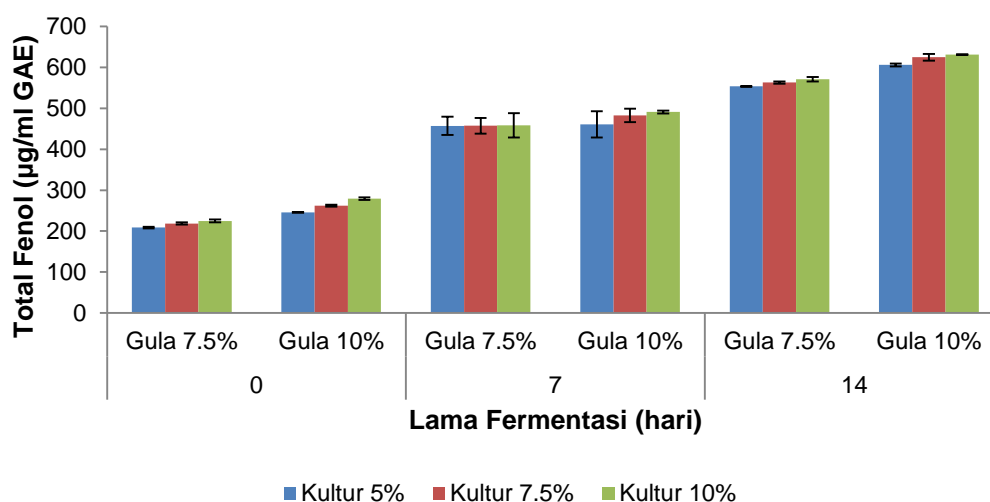
Berdasarkan **Tabel 4.9** menunjukkan semakin tinggi konsentrasi kultur kombucha yang ditambahkan, maka semakin tinggi penurunan total gula pada kombucha salak Suwaru. Kombucha dengan konsentrasi kultur 5% menunjukkan



penurunan total gula tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 10% menunjukkan penurunan total gula terendah. Perbedaan tersebut diduga disebabkan karena kultur dengan konsentrasi 7,5% dan 10% mengalami penurunan aktivitas dalam mengubah gula pereduksi menjadi etanol dan asam organik, pada rentang hari fermentasi ke 7 hingga hari ke 14. Penurunan aktivitas tersebut diduga karena substrat sudah dalam kondisi asam dengan pH yang rendah, yakni berkisar antara 2,49 hingga 2,59, sehingga kemampuan khamir dan bakteri asam asetat dalam mengubah gula pereduksi menjadi etanol dan asam-asam organik mengalami penurunan. Menurut Roukas (1994), kisaran pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae* adalah pada pH 3,5-6,5. Kemudian Elevri dan Putra (2006) menyatakan, produksi etanol oleh *Saccharomyces cerevisiae* paling maksimal dapat dicapai pada pH 4,5, sehingga pada pH yang lebih rendah kemampuan khamir dalam mengkonversi glukosa menjadi etanol mengalami penurunan. Bakteri *Gluconacetobacter* yang banyak tumbuh pada kombucha juga dapat tumbuh optimal pada pH yang lebih tinggi, yakni berkisar 5,4 hingga 6,3 (Hommel, 2004).

#### **4.2.6 Total Fenol**

Rerata total fenol kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 208,68 µg/ml GAE hingga 279,14 µg/ml GAE pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata total fenol berkisar antara 457,00 µg/ml GAE hingga 490,83 µg/ml GAE. Pada hari ke 14, rerata total fenol berkisar antara 553,43 µg/ml GAE hingga 631,10 µg/ml GAE. Perubahan total fenol kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.7**.



**Gambar 4.7** Grafik Rerata Total Fenol Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.7** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai total fenol kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi gula memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan konsentrasi kultur dan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan total fenol pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan total fenol kombucha salak Suwaru akibat penambahan gula dapat dilihat pada **Tabel 4.10**.

**Tabel 4.10** Rerata Total Fenol Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula (%)	Total Fenol (µg/ml GAE)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
7,5	217,32 ± 7,4	457,44 ± 20,9	562,37 ± 8,2	345,05 ± 5,4a	7,88
10	262,40 ± 14,4	478,06 ± 22,4	620,40 ± 12,2	358,00 ± 6,9b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

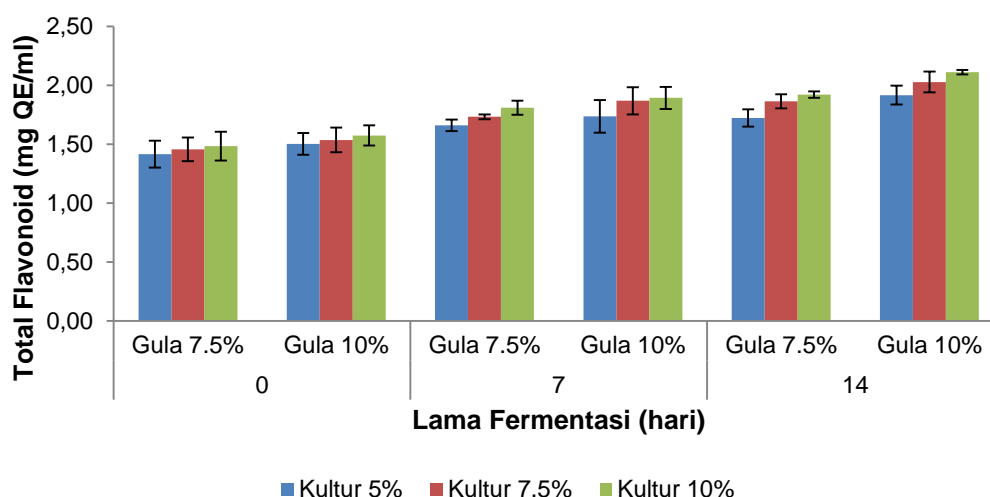
Berdasarkan **Tabel 4.10** menunjukkan total fenol kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan total fenol diduga disebabkan karena adanya aktivitas mikroorganisme yang mengubah senyawa fenol kompleks menjadi senyawa fenol sederhana. Menurut Chakravorty *et al.* (2016), bakteri dan khamir dalam kultur kombucha melepas berbagai jenis enzim yang berfungsi memecah

senyawa kompleks fenol dan flavonoid menjadi bentuk sederhana. Khamir jenis *Candida tropicalis* diketahui dapat memecah berbagai jenis polifenol menjadi bentuk sederhana (Ettayebi *et al.*, 2003). Khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* juga berperan dalam mengubah asam hidroksinat, asam p-kumarat, dan asam ferulat menjadi 4-vinilfenol dan 4-vinilguaiakol (Chatonnet *et al.*, 1993). Menurut Saez *et al.* (2010), *Saccharomyces cerevisiae* mampu menghasilkan dua enzim, yaitu enzim sinamat dekarboksilase dan vinilfenol reduktase. Enzim sinamat dekarboksilase berperan dalam mengkatalis proses dekarboksilasi asam hidroksinat, sedangkan enzim vinilfenol reduktase berperan dalam mengkatalis proses reduksi 4-vinilfenol dan 4-vinilguaiakol menjadi 4-etilfenol dan 4-etilguaiakol. Menurut de Paiva *et al.* (2013), asam ferulat dan asam sinamat merupakan jenis asam fenolat yang terdapat berlimpah pada tanaman. Khamir jenis lain seperti *Brettanomyces bruxellensis* juga mampu menghasilkan senyawa fenol seperti 4-etilfenol dan 4-etilguaiakol (Romano *et al.*, 2008).

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan total fenol seiring dengan peningkatan konsentrasi gula. Kombucha dengan konsentrasi gula 10% menunjukkan peningkatan total fenol tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 7,5% menunjukkan peningkatan total fenol terendah. Hal ini diduga disebabkan karena gula merupakan sumber karbon yang berfungsi mendukung pertumbuhan khamir. Hal ini didukung oleh penelitian Chatonnet *et al.* (1995), yang menyatakan produksi etilfenol meningkat seiring dengan peningkatan jumlah gula yang terfermentasi pada proses *aging wine* merah oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Menurut Martins *et al.* (2011), *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan enzim  $\beta$ -glukosidase yang dapat memecah glikosida, sehingga mampu membebaskan senyawa fenol ke dalam media fermentasi.

#### 4.2.7 Total Flavonoid

Rerata total flavonoid kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 1,42 mg QE/ml hingga 1,57 mg QE/ml pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata total flavonoid berkisar antara 1,66 mg QE/ml hingga 1,89 mg QE/ml. Pada hari ke 14, rerata total flavonoid berkisar antara 1,72 mg QE/ml hingga 2,11 mg QE/ml. Perubahan total flavonoid kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.8**.



**Gambar 4.8** Grafik Rerata Total Flavonoid Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.8** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai total flavonoid kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi gula dan konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan total flavonoid pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan total flavonoid kombucha salak Suwaru akibat penambahan gula dapat dilihat pada **Tabel 4.11**.

**Tabel 4.11** Rerata Total Flavonoid Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula (%)	Total Flavonoid (mg QE/ml)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
7,5	1,45 ± 0,10	1,73 ± 0,08	1,84 ± 0,10	0,38 ± 0,14a	0,04
10	1,54 ± 0,09	1,83 ± 0,12	2,02 ± 0,10	0,48 ± 0,12b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.11** menunjukkan total flavonoid kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan total flavonoid diduga disebabkan karena adanya aktivitas mikroorganisme dalam memecah senyawa flavonoid kompleks menjadi bentuk molekul yang lebih kecil. Hasil ini sesuai dengan penelitian Chakravorty *et al.* (2016), yang menunjukkan teh kombucha mengalami peningkatan jumlah

flavonoid sebanyak 24% selama fermentasi 21 hari. Menurut Ettayebi *et al.* (2003), khamir jenis *Candida tropicalis* berperan dalam mendegradasi berbagai jenis polifenol dan flavonoid. Selama pertumbuhannya, khamir jenis *Candida* menghasilkan enzim untuk memecah senyawa flavonoid seiring dengan peningkatan jumlah selnya. Berdasarkan penelitian Yan *et al.* (2005), khamir jenis *Saccharomyces cerevisiae* memiliki kemampuan mengubah berbagai jenis asam organik menjadi senyawa flavonoid, diantaranya mampu mengubah asam sinamat menjadi pinocembrin, mengubah asam p-kumarat menjadi naringenin, dan mengubah asam kafeat menjadi eriodictyol.

Kandungan flavonoid yang terdapat pada kombucha salak Suwaru diduga berasal dari bahan baku salak yang mengandung epikatekin. Shui dan Leong (2005) menyatakan, senyawa flavonoid yang dominan terkandung dalam buah salak yaitu (-)-epikatekin. Menurut Jayabalan *et al.* (2007), selama fermentasi kombucha terdapat empat isomer epikatekin antara lain epigalokatekin galat, epikatekin galat, epigalokatekin, dan epikatekin. Adanya proses biotransformasi oleh enzim yang dihasilkan dari metabolisme mikroorganisme yang ada pada starter kombucha menyebabkan isomer seperti epigalokatekin galat menjadi epigalokatekin dan isomer epikatekin galat menjadi epikatekin selama proses fermentasi serta pelepasan katekin dari sel mikroorganisme yang sensitif terhadap asam.

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan total flavonoid seiring dengan peningkatan konsentrasi gula. Kombucha dengan konsentrasi gula 10% menunjukkan peningkatan total flavonoid tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 7,5% menunjukkan peningkatan total flavonoid terendah. Hal ini diduga disebabkan karena gula mendukung pertumbuhan khamir dalam memfermentasi substrat. Selain itu gula juga menjadi sumber karbon yang dapat diubah menjadi senyawa flavonoid. Hasil ini sesuai dengan penelitian Koopman *et al.* (2012), yang menunjukkan glukosa menjadi sumber karbon utama dalam pembentukan senyawa flavonoid naringenin oleh *Saccharomyces cerevisiae*. Kadar gula yang tinggi akan mampu mendukung khamir dalam membentuk senyawa flavonoid. Selain itu, adanya penambahan gula (sukrosa) dalam fermentasi kombucha mengaktifkan enzim-enzim seperti invertase yang dihasilkan khamir sehingga terjadi biotransformasi isomer epikatekin dan peningkatan total polifenol (Jayabalan *et al.*, 2007).

Sedangkan peningkatan total flavonoid kombucha salak Suwaru akibat penambahan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.12**.

**Tabel 4.12** Rerata Total Flavonoid Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	Total Flavonoid (mg QE/ml)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
5	1,46 ± 0,10	1,70 ± 0,10	1,82 ± 0,13	0,36 ± 0,15a	
7,5	1,50 ± 0,10	1,80 ± 0,10	1,95 ± 0,11	0,45 ± 0,13b	0,05
10	1,53 ± 0,11	1,85 ± 0,08	2,02 ± 0,11	0,49 ± 0,12b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.12** menunjukkan semakin tinggi konsentrasi kultur kombucha yang ditambahkan, maka semakin tinggi peningkatan total flavonoid pada kombucha salak Suwaru. Kombucha dengan konsentrasi kultur 5% menunjukkan peningkatan total flavonoid terendah, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 10% menunjukkan peningkatan total flavonoid tertinggi. Perbedaan tersebut diduga disebabkan karena adanya jumlah dan jenis enzim yang berbeda pada setiap konsentrasi kultur yang ditambahkan. Konsentrasi kultur yang tinggi diduga dapat mendukung produksi enzim pembentuk senyawa flavonoid lebih banyak dibanding dengan penambahan konsentrasi kultur yang lebih rendah. Menurut Du *et al.* (2011), penggunaan enzim yang beragam dapat mempercepat proses pemecahan senyawa flavonoid.

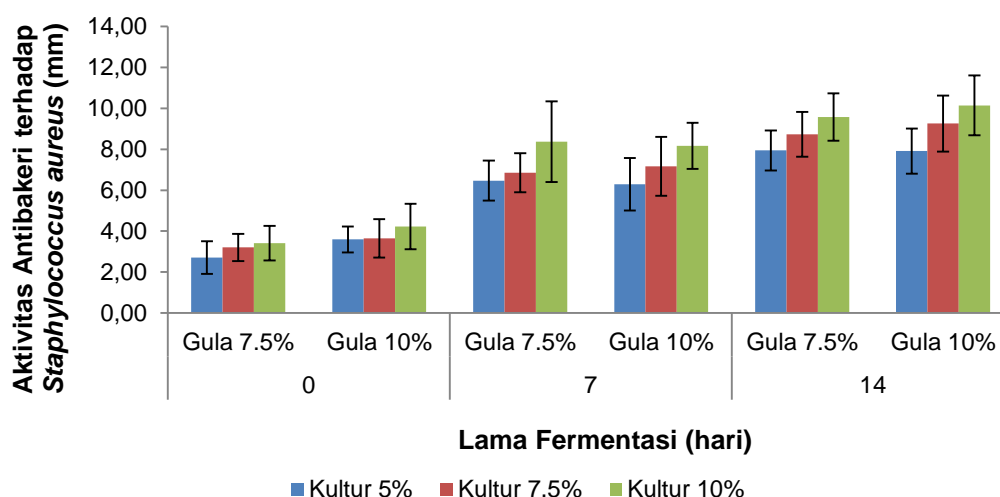
#### 4.2.8 Aktivitas Antibakteri

##### 4.2.8.1 Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

Bakteri Gram positif yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri kombucha salak Suwaru yaitu *Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri kombucha salak Suwaru ditentukan oleh diameter zona bening atau zona hambat yang terbentuk disekitar area sumuran. Kekuatan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri menurut Jannata *et al.* (2014), digolongkan dalam 4 kategori, yaitu diameter zona hambat kurang dari 5 mm dikategorikan lemah, diameter zona hambat 5-10 mm dikategorikan sedang, diameter zona hambat 10-20 mm dikategorikan kuat, dan diameter zona hambat lebih dari 20 mm dikategorikan sangat kuat.

Rerata diameter zona bening yang terbentuk terhadap *Staphylococcus aureus* pada kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi

gula dan kultur berkisar antara 2,71 mm hingga 4,23 mm pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata aktivitas antibakteri berkisar antara 6,29 mm hingga 8,37 mm. Pada hari ke 14, rerata aktivitas antibakteri berkisar antara 7,91 mm hingga 10,14 mm. Perubahan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* selama fermentasi pada kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.9**.



**Gambar 4.9** Grafik Rerata Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.9** menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, aktivitas antibakteri kombucha salak Suwaru terhadap *Staphylococcus aureus* cenderung meningkat. Grafik tersebut juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan kultur, maka aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan konsentrasi gula dan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan diameter zona bening kombucha salak Suwaru akibat penambahan berbagai konsentrasi kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.13**.

**Tabel 4.13** Rerata Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	Aktivitas Antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
5	3,15 ± 0,80	6,38 ± 1,03	7,92 ± 0,93	4,77 ± 0,91a	
7,5	3,43 ± 0,76	7,01 ± 1,10	8,99 ± 1,14	5,56 ± 0,61b	0,71
10	3,82 ± 0,99	8,27 ± 1,44	9,85 ± 1,22	6,03 ± 0,46b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.13** menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Semakin lama waktu fermentasi, maka semakin besar diameter zona bening yang terbentuk disekitar sumuran. Peningkatan aktivitas antibakteri diduga dipengaruhi oleh tingginya kadar asam asetat dan kadar fenol yang terbentuk selama fermentasi. Menurut Greenwalt *et al.* (1998), kombucha memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa jenis bakteri patogen seperti *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, dan *Escherichia coli*. Daya antibakteri yang dimiliki kombucha dipengaruhi oleh adanya kandungan asam asetat. Menurut Naidu (2000), asam-asam asetat yang terlarut akan melepaskan proton-proton bebas sehingga pH mengalami penurunan. Meningkatnya jumlah proton bebas menyebabkan terjadinya denaturasi enzim dan perubahan permeabilitas membran sel, yang menyebabkan destabilisasi membran mikroorganisme. Hal tersebut mengakibatkan transfer ion dan nutrien yang dibutuhkan mikroorganisme untuk tumbuh menjadi terhambat, sehingga metabolisme sel menjadi terhambat.

Aktivitas antibakteri juga dipengaruhi oleh kandungan senyawa fenol yang terdapat pada buah salak Suwaru. Menurut Sahputra (2008), buah salak merupakan buah yang mengandung senyawa tanin. Nurina *et al.* (2014) menambahkan, buah salak mengandung senyawa tanin, flavonoid, dan alkaloid yang berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Sudira *et al.* (2011), senyawa tanin merupakan senyawa organik yang aktif menghambat pertumbuhan mikroba dengan mekanisme merusak dinding sel mikroba dan membentuk ikatan dengan protein fungsional sel mikroba. Tanin juga merupakan senyawa yang bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel. Tanin memiliki sifat antibakteri karena



memiliki gugus piragalol dan galoil (Okoli *et al.*, 2009). Flavonoid juga memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria, 2009).

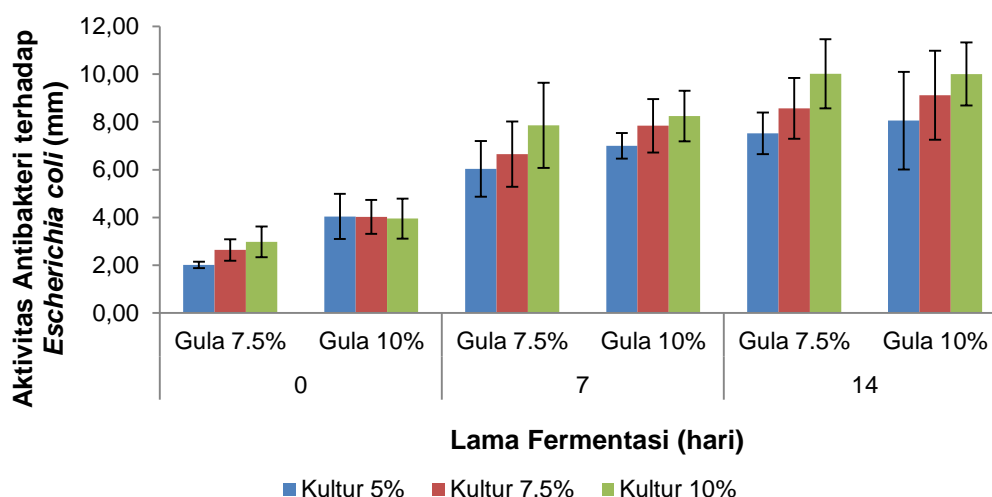
Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* seiring dengan peningkatan konsentrasi kultur yang ditambahkan. Kombucha dengan konsentrasi kultur 5% menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri terendah, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 10% dan 7,5% menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri tertinggi. Hal ini diduga karena kombucha salak Suwaru dengan penambahan konsentrasi kultur 10% dan 7,5% memiliki aktivitas metabolisme khamir dan bakteri lebih cepat jika dibandingkan dengan kombucha salak Suwaru dengan penambahan konsentrasi kultur 5%. Hasil tersebut berkaitan dengan kemampuan adaptasi dari kultur kombucha, semakin cepat beradaptasi maka pertumbuhan khamir dan bakteri dapat berlangsung lebih cepat. Menurut Marwati *et al.* (2013), konsentrasi starter yang ditambahkan berpengaruh nyata terhadap peningkatan total asam dan total mikroba pada teh kombucha. Peningkatan total asam yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Menurut Todar (1998) menyatakan *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada pH 4,2-9,3. Asam organik dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan cara menonaktifkan atau mempengaruhi satu atau beberapa target seperti dinding sel, membran sel, enzim-enzim metabolik, dan sistem sintesa protein.

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif cenderung lebih rentan terhadap komponen antibakteri dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Hal ini disebabkan karena struktur dinding sel bakteri Gram positif lebih sederhana sehingga komponen antibakteri lebih mudah masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Menurut Madigan *et al.* (2003), bakteri Gram positif memiliki dinding sel tebal berlapis tunggal, yang tersusun atas 90% lapisan peptidoglikan serta lapisan tipis asam teikoat dan asam teikuronat. Jawetz *et al.* (2005) menambahkan, struktur dinding sel bakteri Gram positif memiliki kandungan lipid yang rendah (1-4%) sehingga menyebabkan senyawa bioaktif masuk ke dalam sel. Perbedaan struktur dinding sel pada mikroorganisme dapat menentukan penetrasi, ikatan dan aktivitas senyawa antibakteri. Kandungan fenol yang terdapat pada kombucha

berpengaruh terhadap aktivitas penghambatan bakteri *Staphylococcus aureus*. Menurut Yulianti *et al.* (2009), senyawa fenol memiliki kemampuan untuk memutus ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel, sehingga senyawa fenol memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif lebih baik jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Senyawa fenol lainnya yaitu tanin memiliki peran dalam menghambat sintesa peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Keadaan ini menyebabkan bakteri mengalami lisis akibat adanya tekanan osmotik (Safera, 2005). Gilman *et al.* (1991) menambahkan, ion H<sup>+</sup> dari senyawa fenol dan turunannya dapat menyerang gugus fosfat pada membran sel sehingga menyebabkan molekul fosfolipid terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Keadaan tersebut menyebabkan membran sel menjadi bocor dan bakteri dapat mengalami kematian.

#### **4.2.8.2 Aktivitas Antibakteri terhadap *Escherichia coli***

Bakteri Gram negatif yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri kombucha salak Suwaru yaitu *Escherichia coli*. Rerata diameter zona bening yang terbentuk terhadap *Escherichia coli* pada kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 3,02 mm hingga 4,29 mm pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata aktivitas antibakteri berkisar antara 6,04 mm hingga 8,24 mm. Pada hari ke 14, rerata aktivitas antibakteri berkisar antara 7,53 mm hingga 10,01 mm. Perubahan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* selama fermentasi pada kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.10**.



**Gambar 4.10** Grafik Rerata Aktivitas Antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.10** menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi, aktivitas antibakteri kombucha salak Suwaru terhadap *Escherichia coli* cenderung meningkat. Grafik tersebut juga menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan kultur, maka aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan konsentrasi gula dan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan diameter zona bening kombucha salak Suwaru akibat penambahan berbagai konsentrasi kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.14**.

**Tabel 4.14** Rerata Aktivitas Antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	Aktivitas Antibakteri terhadap <i>Escherichia coli</i> (mm)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
5	3,30 ± 0,52	6,52 ± 0,97	7,79 ± 1,44	4,49 ± 1,07a	1,30
7,5	3,66 ± 0,67	7,25 ± 1,29	8,84 ± 1,46	5,18 ± 0,98a	
10	3,97 ± 0,62	8,05 ± 1,32	9,68 ± 1,15	5,71 ± 0,67b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.14** menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Semakin lama waktu

fermentasi, maka semakin besar diameter zona bening yang terbentuk disekitar sumuran. Peningkatan aktivitas antibakteri selama fermentasi diduga karena terbentuknya asam-asam organik dan senyawa fenol yang dihasilkan oleh metabolisme khamir dan bakteri. Menurut Zubaidah dan Sari (2015), semakin tinggi total fenol dan total asam maka semakin besar diameter zona bening yang dihasilkan, yang menandakan aktivitas senyawa antibakteri semakin tinggi.

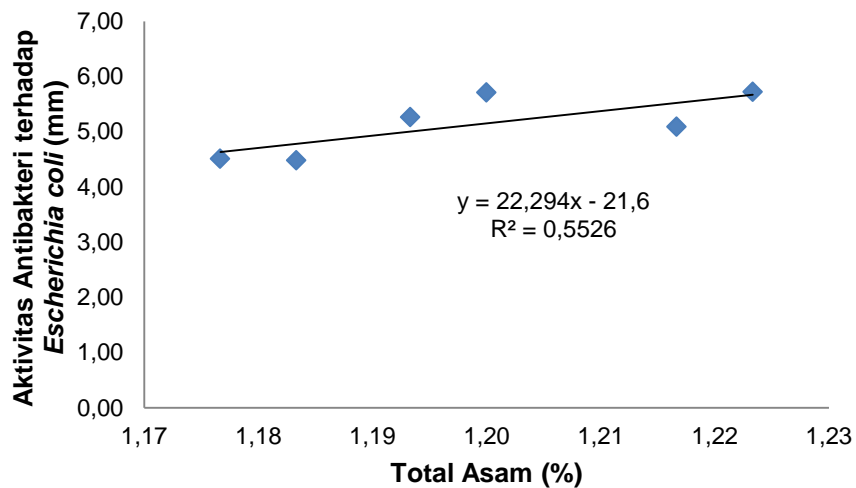
Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* seiring dengan peningkatan konsentrasi kultur yang ditambahkan. Kombucha dengan konsentrasi kultur 5% dan 7,5% menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri terendah, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 10% menunjukkan peningkatan aktivitas antibakteri tertinggi. Hal ini diduga karena kombucha salak Suwaru dengan penambahan konsentrasi kultur 10% memiliki kemampuan adaptasi kultur yang lebih baik pada substrat sari salak, sehingga aktivitas metabolisme khamir dan bakteri lebih cepat jika dibandingkan dengan kombucha salak Suwaru dengan penambahan konsentrasi kultur 7,5% dan 5%. Menurut Santos *et al.* (2009), dalam fermentasi kombucha khamir berperan dalam memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, kemudian mengubahnya menjadi karbon dioksida dan etanol. Bakteri asam asetat berperan dalam mengoksidasi etanol menjadi asam asetat.

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang termasuk dalam golongan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif cenderung lebih resisten terhadap senyawa antibakteri jika dibandingkan dengan bakteri Gram positif karena struktur dinding selnya lebih kompleks. Menurut Madigan *et al.* (2003), lapisan dinding sel bakteri Gram negatif mengandung 5-10% peptidoglikan, selebihnya terdiri dari protein, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Menurut Ray (1996), bakteri Gram negatif lebih sensitif terhadap pH rendah dibandingkan dengan bakteri Gram positif. *Escherichia coli* dapat tumbuh pada pH netral dengan pH optimum 6,0-8,0 (Robinson *et al.*, 2000). Asam asetat yang terdisosiasi (terurai) dan melepaskan proton-proton bebas menyebabkan pH larutan menurun. Meningkatnya jumlah proton dapat menyebabkan denaturasi enzim dan perubahan permeabilitas membran sel sehingga metabolisme sel terganggu dan perlahan-lahan bakteri mati (Naidu, 2000). Mekanisme antibakteri kombucha salak Suwaru terhadap *Escherichia coli* juga dipengaruhi oleh komponen lipid yang banyak terdapat pada dinding sel. Menurut Okoli *et al.* (2009), tanin

merupakan senyawa yang bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel. Tanin memiliki sifat antibakteri karena memiliki gugus piragalol dan galolil. Ajizah (2007) menambahkan, tanin dapat mengerutkan dinding sel sehingga dapat mengganggu permeabilitas sel. Flavonoid yang terkandung pada kombucha salak Suwaru diduga juga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Mekanisme antibakteri flavonoid yaitu dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria, 2009).

Berdasarkan hasil analisa terdapat perbedaan kemampuan antibakteri kombucha salak Suwaru terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri Gram positif cenderung lebih rentan terhadap daya antibakteri kombucha salak Suwaru, jika dibandingkan dengan *Escherichia coli* yang merupakan bakteri Gram negatif. Hasil ini ditandai dengan diameter zona bening pada bakteri Gram positif yang lebih besar jika dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Hal ini diduga karena perbedaan struktur penyusun dinding sel antara bakteri Gram positif dengan bakteri Gram negatif. Hasil analisa tersebut sesuai dengan penelitian Battikh *et al.* (2012), yang menunjukkan aktivitas antibakteri kombucha teh hitam terhadap *Staphylococcus aureus* lebih besar jika dibandingkan dengan bakteri *Escherichia coli*.

Dari hasil analisa tersebut, dilakukan analisa korelasi antara peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan peningkatan total asam dan peningkatan total fenol pada kombucha salak Suwaru. Hasil analisa pada **Lampiran 4** menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri kombucha salak Suwaru terhadap *Escherichia coli* dipengaruhi oleh faktor total asam dan total fenol sebesar 85,4%. Peningkatan total asam menunjukkan korelasi yang berpengaruh nyata terhadap peningkatan aktivitas antibakteri *Escherichia coli*, sedangkan peningkatan total fenol menunjukkan korelasi yang tidak berpengaruh nyata. Grafik korelasi total asam dan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* pada kombucha salak Suwaru dapat dilihat pada **Gambar 4.11**.



**Gambar 4.11** Grafik Korelasi Hubungan Peningkatan Total Asam dan Peningkatan Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli* pada Kombucha Salak Suwaru

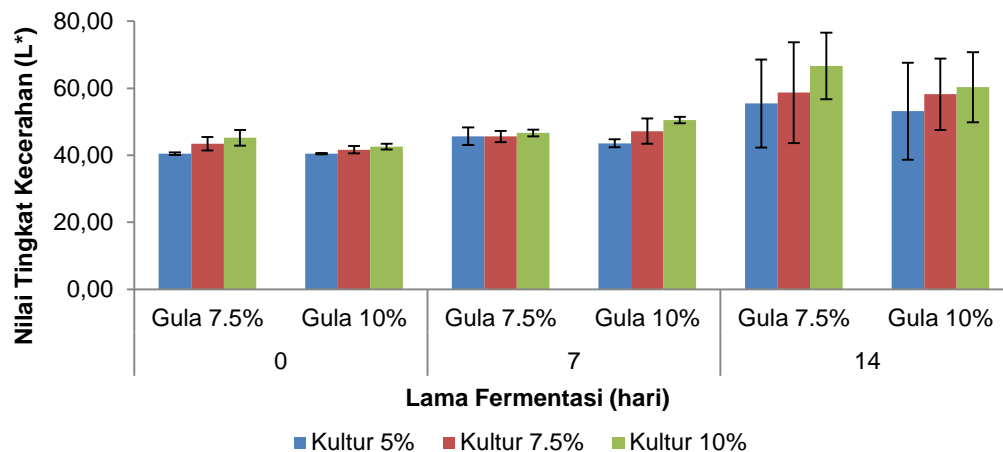
**Gambar 4.11** menunjukkan bahwa terjadi korelasi positif antara peningkatan total asam dan peningkatan aktivitas antibakteri yang berarti semakin tinggi nilai peningkatan total asam, maka peningkatan aktivitas antibakteri akan semakin tinggi. Persamaan korelasi  $Y = 22,294x - 21,6$  dengan koefisien determinasi  $R^2 = 0,5526$  menunjukkan nilai korelasi yang lemah. Menurut Battikh *et al.* (2012), aktivitas antibakteri pada kombucha tidak hanya dipengaruhi oleh tingkat keasaman atau jumlah kandungan asam organik yang terbentuk selama fermentasi, namun juga dipengaruhi oleh senyawa-senyawa lain seperti protein, antibiotik, enzim, atau metabolit lain hasil biosintesis selama fermentasi.

#### 4.2.9 Analisa Warna

Pengukuran warna kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dilakukan menggunakan *color reader*. Parameter yang diamati antara lain intensitas kecerahan ( $L^*$ ), intensitas warna merah ( $a^+$ ), dan intensitas warna kuning ( $b^+$ ). Menurut Pomeranz dan Meloan (1994), nilai kecerahan ( $L$ ) ditentukan dengan kisaran 0-100, dimana nilai 0 menyatakan warna hitam dan nilai 100 menyatakan warna putih. Nilai  $a$  dan  $b$  mempunyai kisaran -100 hingga +100. Nilai ( $-a$ ) menyatakan warna hijau, ( $+a$ ) menyatakan warna merah, sedangkan ( $-b$ ) menyatakan warna biru dan ( $+b$ ) menyatakan warna kuning.

#### 4.2.9.1 Analisa Tingkat Kecerahan (L\*)

Rerata tingkat kecerahan (L\*) kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 40,50 hingga 45,23 pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata tingkat kecerahan berkisar antara 43,57 hingga 50,50. Pada hari ke 14, rerata tingkat kecerahan berkisar antara 53,17 hingga 66,63. Perubahan tingkat kecerahan kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.12**.



**Gambar 4.12** Grafik Rerata Tingkat Kecerahan (L\*) Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.12** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai tingkat kecerahan (L\*) kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan konsentrasi gula dan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan nilai kecerahan pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan nilai kecerahan kombucha salak Suwaru akibat penambahan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.15**.

**Tabel 4.15** Rerata Tingkat Kecerahan (L\*) Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	Nilai Tingkat Kecerahan (L*)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
5	40,50 ± 0,26	44,62 ± 2,15	54,30 ± 12,43	13,80 ± 12,28a	
7,5	42,53 ± 1,73	46,41 ± 2,75	58,45 ± 11,65	15,92 ± 12,72a	4,44
10	43,92 ± 2,14	48,58 ± 2,28	63,47 ± 9,78	19,55 ± 10,22b	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

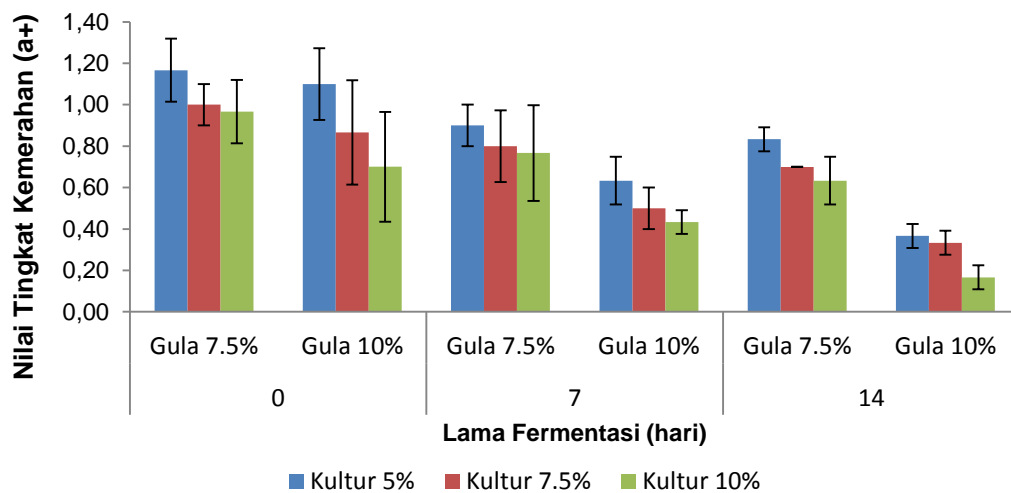
Berdasarkan **Tabel 4.15** menunjukkan tingkat kecerahan (L\*) kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan nilai kecerahan diduga karena terjadinya peningkatan total asam dan penurunan pH selama fermentasi, sehingga warna kombucha salak Suwaru menjadi lebih terang. Menurut Anugrah (2005), warna kombucha cenderung berubah menjadi lebih cerah atau terang jika medium kombucha memiliki pH kurang dari 7.

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan nilai kecerahan seiring dengan peningkatan konsentrasi kultur. Kombucha dengan konsentrasi kultur 10% menunjukkan peningkatan nilai kecerahan tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi kultur 5% dan 7,5% menunjukkan peningkatan nilai kecerahan terendah. Hal tersebut diduga karena pada kombucha salak Suwaru dengan penambahan konsentrasi kultur yang tinggi mampu lebih mudah beradaptasi dengan baik, sehingga aktivitas metabolisme dan pertumbuhannya dapat berlangsung lebih cepat. Menurut Goh *et al.* (2012), selama fermentasi, khamir memanfaatkan gula sebagai sumber nutrisi dan menghasilkan etanol, *Acetobacter* mengoksidasi etanol menjadi asetaldehid kemudian diubah menjadi asam asetat. *Acetobacter* juga memanfaatkan glukosa untuk menghasilkan asam glukonat. Asam-asam organik yang dihasilkan selama fermentasi melepaskan ion-ion H<sup>+</sup> sehingga dapat menurunkan nilai pH dan menyebabkan suasana media fermentasi menjadi asam. Kondisi asam tersebut dapat merusak struktur dari tanin sehingga warna medium kombucha menjadi lebih cerah. Menurut Potter dan Hotchkiss (1995) pada larutan yang bersifat basa tanin akan berwarna coklat gelap dan apabila pada suasana asam maka larutan akan terlihat cerah karena kerusakan tanin.



#### 4.2.9.2 Analisa Tingkat Kemerahan (a+)

Rerata tingkat kemerahan (a+) kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 0,87 hingga 1,17 pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata tingkat kemerahan berkisar antara 0,43 hingga 0,90. Pada hari ke 14, rerata tingkat kemerahan berkisar antara 0,17 hingga 0,83. Perubahan tingkat kemerahan kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.13**.



**Gambar 4.13** Grafik Rerata Tingkat Kemerahan (a+) Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.13** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai tingkat kemerahan (a+) kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi gula memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan konsentrasi kultur dan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan nilai kemerahan pada kombucha salak Suwaru. Rerata penurunan nilai kemerahan kombucha salak Suwaru akibat penambahan gula dapat dilihat pada **Tabel 4.16**.

**Tabel 4.16** Rerata Tingkat Kemerahan (a+) Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Gula

Konsentrasi Gula (%)	Nilai Tingkat Kemerahan (a+)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Penurunan	
7,5	1,04 ± 0,15	0,82 ± 0,16	0,72 ± 0,11	0,32 ± 0,16a	0,20
10	0,89 ± 0,27	0,52 ± 0,12	0,29 ± 0,11	0,60 ± 0,25b	

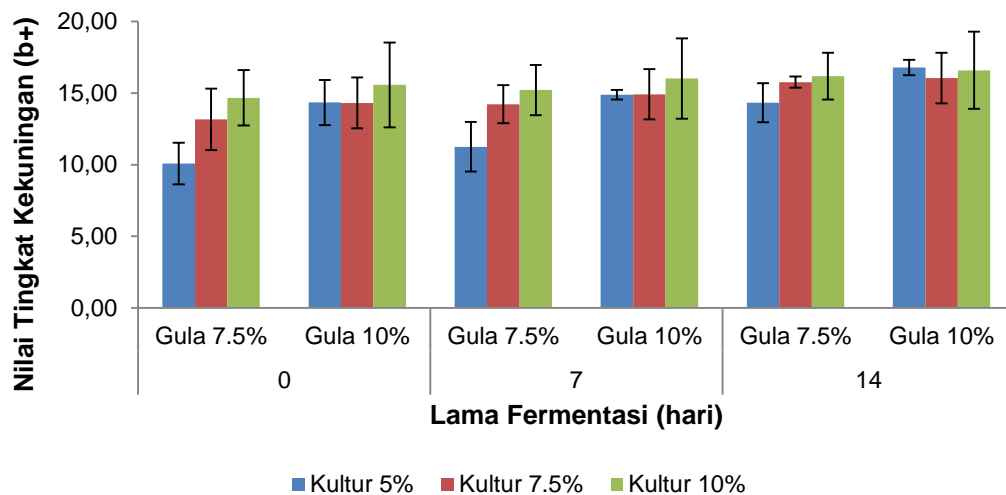
Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.16** menunjukkan tingkat kemerahan (a+) kombucha salak Suwaru cenderung mengalami penurunan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Penurunan nilai kemerahan diduga disebabkan oleh terjadinya kerusakan pigmen akibat meningkatnya total asam dan menurunnya pH selama fermentasi. Zat pigmen yang terdapat pada salak adalah tanin. Menurut Potter dan Hotchkiss (1995), dalam larutan basa tanin akan memberikan warna coklat gelap, sedangkan pada suasana asam tanin akan mengalami kerusakan dan memudar.

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami penurunan nilai kemerahan seiring dengan peningkatan konsentrasi gula. Kombucha dengan konsentrasi gula 10% menunjukkan penurunan nilai kemerahan tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 5% menunjukkan penurunan nilai kemerahan terendah. Hal tersebut diduga karena peningkatan konsentrasi gula dapat meningkatkan aktivitas mikroorganisme dalam menghasilkan asam-asam organik, sehingga kondisi asam dapat mengubah struktur pigmen dan berpengaruh terhadap warna kombucha. Menurut Goh *et al.* (2012), sumber karbon dengan konsentrasi yang sesuai akan mendukung pertumbuhan sel khamir, sehingga sel khamir dapat menghasilkan metabolit yang dapat digunakan oleh bakteri asam asetat.

#### 4.2.9.3 Analisa Tingkat Kekuningan (b+)

Rerata tingkat kekuningan (b+) kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 10,08 hingga 15,57 pada hari ke 0. Pada hari ke 7, rerata tingkat kekuningan berkisar antara 11,25 hingga 16,02. Pada hari ke 14, rerata tingkat kekuningan berkisar antara 14,32 hingga 16,78. Perubahan tingkat kekuningan kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dapat dilihat pada **Gambar 4.14**.



**Gambar 4.14** Grafik Rerata Tingkat Kekuningan (b+) Kombucha Salak Suwaru dengan Variasi Penambahan Konsentrasi Gula dan Kultur

Pada **Gambar 4.14** menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan gula dan semakin tinggi konsentrasi penambahan kultur, maka nilai tingkat kemerahan (a+) kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan. Hasil analisa ragam menunjukkan bahwa konsentrasi kultur memberi pengaruh nyata ( $\alpha=0,05$ ), sedangkan konsentrasi gula dan interaksi antar perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata terhadap peningkatan nilai kekuningan pada kombucha salak Suwaru. Rerata peningkatan nilai kekuningan kombucha salak Suwaru akibat penambahan kultur dapat dilihat pada **Tabel 4.17**.

**Tabel 4.17** Rerata Tingkat Kekuningan (b+) Kombucha Salak Suwaru Selama Fermentasi Akibat Penambahan Berbagai Konsentrasi Kultur

Konsentrasi Kultur (%)	Nilai Tingkat Kekuningan (b+)				BNT 5%
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Peningkatan	
5	12,21 ± 2,70	13,06 ± 2,28	15,55 ± 1,63	3,34 ± 1,71b	1,60
7,5	13,74 ± 1,87	14,56 ± 1,44	15,89 ± 1,15	2,16 ± 1,72a	
10	15,12 ± 2,29	15,61 ± 2,13	16,38 ± 2,00	1,26 ± 1,11a	

Keterangan: Angka pada kolom dengan huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT 5%

Berdasarkan **Tabel 4.17** menunjukkan tingkat kekuningan (b+) kombucha salak Suwaru cenderung mengalami peningkatan seiring bertambahnya waktu fermentasi. Peningkatan nilai kekuningan diduga disebabkan oleh perubahan pigmen tanin yang terjadi selama fermentasi. Zat tanin yang terdapat dalam buah salak memiliki karakteristik berwarna coklat, sehingga kerusakan pada tanin akan

memudahkan warna coklat dan memberi warna kekuningan pada kombucha salak Suwaru. Menurut Potter dan Hotchkiss (1995), dalam suasana asam, tanin akan mengalami degradasi sehingga menyebabkan meningkatnya nilai kekuningan.

Kombucha salak Suwaru juga cenderung mengalami peningkatan nilai kekuningan seiring dengan penurunan konsentrasi kultur yang diberikan. Kombucha dengan konsentrasi kultur 5% menunjukkan peningkatan nilai kekuningan tertinggi, sedangkan kombucha dengan konsentrasi gula 5% dan 7,5% menunjukkan peningkatan nilai kekuningan terendah. Hal tersebut diduga karena pada pemberian kultur dengan konsentrasi tinggi, khamir dan bakteri menjadi lebih cepat mati kemudian mengendap dan mempengaruhi warna kekuningan.

#### 4.2.10 Uji Organoleptik

Uji organoleptik kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur dilakukan dengan menggunakan metode uji *hedonic scale scoring* dengan melibatkan 27 orang panelis tidak terlatih. Tujuan dari pengujian organoleptik hedonik ini adalah untuk menilai respon subjektif dalam hal penerimaan terhadap karakteristik kombucha salak Suwaru yang disajikan. Dalam pengujian ini, panelis diminta untuk memberikan skor angka kesukaan terhadap produk yang berbeda untuk mengungkapkan kesukaan atau ketidaksukaannya terhadap karakteristik produk yang disajikan. Tingkat kesukaan ini disebut sebagai skala hedonik. Skala hedonik yang digunakan dalam uji organoleptik hedonik ini adalah angka 1 – 7, yaitu 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = netral, 5 = agak suka, 6 = suka, dan 7 = sangat suka. Hasil uji hedonik dihitung dengan menggunakan rumus perbandingan berganda dan dinyatakan tidak berbeda nyata apabila:

$$\begin{aligned}
 [R_i - R_j] &\leq \frac{Z_{(1-\alpha)}}{k(k-1)} \sqrt{\frac{bk(k-1)}{6}} \\
 &\leq \frac{Z_{(1-[0,05])}}{6(6-1)} \sqrt{\frac{27 \times 6(6-1)}{6}} \\
 &\leq Z_{(0,9983)} \sqrt{162} \\
 &\leq 39,87
 \end{aligned}$$

Pada uji organoleptik, digunakan 3 parameter tingkat kesukaan yaitu rasa, warna, dan aroma. Data hasil uji organoleptik dapat dilihat pada **Tabel 4.18**.

**Tabel 4.18** Rerata Tingkat Kesukaan Panelis terhadap Rasa, Warna, dan Aroma Kombucha Salak Suwaru

Konsentrasi Gula (%)	Konsentrasi Kultur (%)	Parameter Uji Organoleptik		
		Rasa	Warna	Aroma
7,5	5	3,85	4,85	3,63
	7,5	4,44	5,00	4,26
	10	3,81	4,44	3,67
10	5	4,19	5,33	4,30
	7,5	4,44	5,04	4,44
	10	4,74	4,52	4,37

Berdasarkan **Tabel 4.18** rerata nilai kesukaan panelis terhadap rasa kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 3,81 (agak tidak suka / netral) hingga 4,74 (netral / agak suka). Kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 10% dan konsentrasi kultur 10% memiliki rerata tingkat kesukaan panelis terhadap rasa yang paling tinggi yaitu sebesar 4,74 (netral / agak suka), sedangkan kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 7,5% dan konsentrasi kultur 10% memiliki rerata tingkat kesukaan panelis terhadap rasa yang paling rendah yaitu sebesar 3,81 (agak tidak suka / netral). Hasil analisa statistik yang dilakukan dengan menggunakan uji Friedman, menunjukkan bahwa produk kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur memberikan pengaruh yang nyata ( $\alpha=0,05$ ) terhadap tingkat kesukaan panelis terhadap rasa kombucha salak Suwaru yang dihasilkan (**Lampiran 5**). Penambahan gula dan kultur dengan konsentrasi 10% diduga memberikan karakteristik rasa yang asam dan manis yang sesuai sehingga disukai oleh panelis, sedangkan penambahan gula dengan konsentrasi 7,5% dinilai kurang memberikan rasa manis terhadap rasa kombucha salak Suwaru. Rasa yang terlalu asam dan kurang manis diduga kurang disukai panelis. Menurut Anugrah (2005), semakin lama fermentasi pada kombucha rasa yang dihasilkan akan semakin asam, hal ini dikarenakan khamir dan bakteri melakukan metabolisme terhadap sukrosa dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam asetat, asam glukoronat dan asam glukonat.

Rerata nilai kesukaan panelis terhadap warna kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 4,44

(netral) hingga 5,33 (agak suka). Kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 10% dan konsentrasi kultur 5% memiliki rerata tingkat kesukaan panelis terhadap warna yang paling tinggi yaitu sebesar 5,33 (agak suka), sedangkan kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 7,5% dan konsentrasi kultur 10% memiliki rerata tingkat kesukaan panelis terhadap rasa yang paling rendah yaitu sebesar 4,44 (netral). Hasil analisa statistik yang dilakukan dengan menggunakan uji Friedman, menunjukkan bahwa produk kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur memberikan pengaruh yang nyata ( $\alpha=0,05$ ) terhadap tingkat kesukaan panelis terhadap warna kombucha salak Suwaru yang dihasilkan (**Lampiran 5**). Rendahnya tingkat kesukaan panelis terhadap warna pada kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 7,5% dan konsentrasi kultur 10% diduga karena terjadinya degradasi zat pigmen dalam kombucha akibat tingginya konsentrasi kultur yang diberikan sehingga warna yang dihasilkan cenderung memudar. Menurut Anugrah (2005), selama fermentasi terjadi perubahan warna yang disebabkan oleh penurunan pH dan peningkatan asam organik. Dalam kondisi asam, warna kombucha yang awalnya memiliki warna coklat menjadi memudar dan menjadi kurang menarik.

Rerata nilai kesukaan panelis terhadap aroma kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur berkisar antara 3,63 (agak tidak suka / netral) hingga 4,44 (netral). Kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 10% dan konsentrasi kultur 7,5% memiliki rerata tingkat kesukaan panelis terhadap aroma yang paling tinggi yaitu sebesar 4,44 (netral), sedangkan kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 7,5% dan konsentrasi kultur 5% memiliki rerata tingkat kesukaan panelis terhadap aroma yang paling rendah yaitu sebesar 3,63 (agak tidak suka / netral). Hasil analisa statistik yang dilakukan dengan menggunakan uji Friedman, menunjukkan bahwa produk kombucha salak Suwaru dengan variasi penambahan konsentrasi gula dan kultur memberikan pengaruh yang nyata ( $\alpha=0,05$ ) terhadap tingkat kesukaan panelis terhadap aroma kombucha salak Suwaru yang dihasilkan (**Lampiran 5**). Perbedaan tingkat kesukaan panelis terhadap aroma diduga karena selama fermentasi, kultur kombucha menghasilkan asam-asam organik dan senyawa volatil sebagai hasil metabolit dengan memanfaatkan gula yang menyebabkan munculnya aroma yang kuat dan khas. Menurut Anugrah (2005), bahwa kultur kombucha memiliki peran yang besar dalam menghasilkan aroma pada

kombucha. Kultur kombucha menghasilkan komponen berupa asam volatil seperti asam format, asam asetat, asam propionat, dan asam butirat, serta senyawa karbonil seperti asetaldehid, aseton, diasetil, dan berbagai komponen lain yang dapat memberikan aroma khas kombucha. Selain itu, menurut Wood (1998), khamir memiliki kemampuan dalam menghasilkan komponen-komponen penghasil aroma dan rasa. Selain mengubah molekul-molekul pada bahan dasar, khamir juga mampu mensintesis substansi penghasil aroma dan rasa dari hasil metabolisme primer maupun sekunder. Komponen-komponen yang dibebaskan dari hasil autolisis khamir juga berpengaruh terhadap aroma. Reaksi antara alkohol dan asam-asam organik yang dimediasi oleh enzim akan menghasilkan ester.

#### **4.3 Penentuan Perlakuan Terbaik Kombucha Salak Suwaru**

Penentuan perlakuan terbaik pada penelitian ini menggunakan metode *Multiple Attribute* (Zeleny, 1982). Penilaian ini dilakukan dengan melihat parameter fisik, kimia, dan mikrobiologi dari kombucha salak Suwaru. Penentuan perlakuan terbaik berdasarkan tingkat kerapatannya dimana perlakuan yang memiliki tingkat kerapatan paling kecil dinyatakan sebagai perlakuan terbaik. Parameter yang dianalisa meliputi total bakteri, total khamir, total asam, pH, total gula, total fenol, total flavonoid, aktivitas antibakteri, dan warna. Nilai ideal yang diharapkan pada parameter total bakteri, total khamir, total asam, total fenol, total flavonoid, aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, tingkat kecerahan, tingkat kemerahan, dan tingkat kekuningan adalah nilai maksimal. Nilai ideal yang diharapkan untuk parameter total gula dan pH adalah nilai minimal. Berdasarkan perhitungan, kombucha salak Suwaru dengan konsentrasi gula 10% dan kultur 10% merupakan kombucha salak Suwaru dengan perlakuan terbaik (**Lampiran 8**). Nilai masing-masing parameter kombucha salak Suwaru dengan perlakuan terbaik dapat dilihat pada **Tabel 4.19**.

**Tabel 4.19** Karakteristik Kombucha Salak Suwaru Perlakuan Terbaik

Parameter	Perlakuan Terbaik
Total bakteri (CFU/ml)	5,5 x 10 <sup>6</sup>
Total khamir (CFU/ml)	6,1 x 10 <sup>8</sup>
Total asam (%)	1,61
pH	2,40
Total gula (%)	7,91
Total fenol (µg/ml GAE)	631,10
Total flavonoid (mg QE/ml)	2,11
Antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	10,14
Antibakteri terhadap <i>Escherichia coli</i> (mm)	10,01
Nilai L*	60,30
Nilai a+	0,17
Nilai b+	16,59

#### 4.4 Uji-T Perbandingan Kombucha Salak Suwaru Perlakuan Terbaik dengan Kombucha Kontrol

Perbandingan nilai antara perlakuan terbaik dengan kontrol dianalisa menggunakan uji T dengan taraf 5%. Nilai perlakuan terbaik dengan parameter fisik, kimia, dan mikrobiologis kombucha salak Suwaru perlakuan terbaik dengan kontrol berupa kombucha dari teh hitam dapat dilihat pada **Tabel 4.20**.

**Tabel 4.20** Data Hasil Analisa Uji-T Kombucha Salak Suwaru Perlakuan Terbaik dengan Kombucha Kontrol

Perlakuan	Kombucha Salak Suwaru (Gula 10% dan Kultur 10%)	Kombucha Kontrol (Teh Hitam)	P-value	Notasi
Total Bakteri (CFU/ml)	5,5 x 10 <sup>6</sup>	2,6 x 10 <sup>6</sup>	0,116	tn
Total Khamir (CFU/ml)	6,1 x 10 <sup>8</sup>	9,2 x 10 <sup>7</sup>	0,039	*
Total Asam (%)	1,61	0,65	0,002	*
pH	2,40	3,11	0,018	*
Total Gula (%)	7,91	3,18	0,003	*
Total Fenol (µg/ml GAE)	631,10	627,71	0,865	tn
Total Flavonoid (mg QE/ml)	2,11	1,10	0,005	*
Antibakteri terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)	10,14	5,80	0,036	*
Antibakteri terhadap <i>Escherichia coli</i> (mm)	10,01	5,37	0,025	*
Nilai L*	60,30	27,03	0,019	*
Nilai a+	0,17	2,48	0,012	*
Nilai b+	16,59	14,57	0,309	tn

Berdasarkan **Tabel 4.20** parameter total khamir, total asam, pH, total gula, total flavonoid, aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, tingkat kecerahan dan tingkat kemerahan memiliki nilai *P*-value < 0,05. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antara perlakuan terbaik dan kontrol berbeda secara signifikan. Sedangkan pada parameter total bakteri, total



fenol, dan tingkat kekuningan memiliki nilai  $P\text{value} > 0,05$ . Hasil tersebut menunjukkan bahwa antara perlakuan terbaik dan kontrol tidak berbeda secara signifikan. Tingkat kemerahan dan pH kombucha salak Suwaru menunjukkan nilai yang lebih kecil jika dibandingkan kombucha teh hitam. Sedangkan pada parameter total khamir, total asam, total gula, total fenol, total flavonoid, aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, dan tingkat kecerahan menunjukkan kombucha salak Suwaru dengan penambahan konsentrasi gula 10% dan kultur 10% memiliki nilai yang lebih besar jika dibandingkan kombucha teh hitam. Hasil ini diduga berkaitan dengan tingginya nutrisi dan aktivitas metabolisme mikroorganisme yang tinggi pada kombucha salak Suwaru, sehingga menyebabkan karakteristik fisik, kimia, dan mikrobiologi menjadi berbeda dibandingkan dengan kombucha kontrol.

Kombucha salak Suwaru dapat diaplikasikan sebagai minuman fungsional yang memiliki berbagai manfaat kesehatan bagi tubuh. Tingginya kandungan senyawa fenolik pada kombucha salak Suwaru dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan antibakteri seperti kombucha teh pada umumnya. Menurut Chakravorty *et al.* (2016), kombucha memiliki manfaat sebagai antimikroba, antioksidan, anti-karsinogenik, membantu menyembuhkan tukak lambung dan kolesterol tinggi. Kombucha juga berpengaruh terhadap respon imun dan detoksifikasi liver.