

**PENGARUH PENINGKATAN WAKTU FERMENTASI TEH
KOMBUCHA TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus
aureus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

OLEH :

**VERI INDRIYANI
158700056**




**FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS MEDAN AREA
MEDAN
2018**

**PENGARUH PENINGKATAN WAKTU FERMENTASI TEH
KOMBUCHA TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus
aureus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

OLEH :

**VERI INDRIYANI
158700056**



**Skripsi Sebagai Syarat Untuk
Mendapatkan Gelar Sarjana di Fakultas Biologi
Universitas Medan Area**

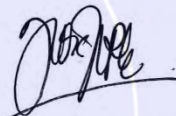
**FAKULTAS BIOLOGI
UNIVERSITAS MEDAN AREA
MEDAN
2018**

Judul Skripsi :PENGARUH PENINGKATAN WAKTU
FERMENTASI TEH KOMBUCHA TERHADAP
PERUMBUHAN BAKTERI *Staphylococcus aureus*
SECARA *IN VITRO*
Nama : Veri Indriyani
NPM : 158700056
Program Studi : S-1 Ilmu Biologi
Fakultas : Biologi Universitas Medan Area


Disetujui oleh
Komisi Pembimbing



Ida Fauziah, S.Si, M.Si
Pembimbing I



Rahmiati, S.Si, M.Si
Pembimbing II



Dr. Mufti Sudibyo, M.Si
Dekan



Dra. Sartini M.Sc
Ka. Prodi/WD 1

Tanggal Lulus : 05 Oktober 2018

LEMBAR PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi yang saya susun, sebagai syarat memperoleh gelar sarjana merupakan hasil karya tulis saya sendiri. Adapun bagian-bagian tertentu dalam penulisan skripsi ini yang saya kutip dari hasil karya orang lain telah dituliskan sumbernya secara jelas sesuai dengan norma, kaidah dan etika penulisan ilmiah.

Saya bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang saya peroleh dan sanksi-sanksi lainnya dengan peraturan yang berlaku, apabila dikemudian hari ditemukannya adanya plagiat dalam skripsi ini.



**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
SKRIPSI UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Medan Area, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Veri Indriyani
NPM : 158700056
Program Studi : Biologi
Fakultas : Biologi
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Medan Area **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (Non-exclusive Royalty-Free Right)** atas karya ilmiah saya yang berjudul : Pengaruh Peningkatan Waktu Fermentasi Teh Kombucha Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*.

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Medan Area berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan memublikasikan skripsi saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan
Pada tanggal :
Yang menyatakan



(Veri Indriyani)

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh peningkatan waktu fermentasi teh kombucha terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Terdapat 4 perlakuan yaitu fermentasi kombucha selama 10 hari, 14 hari, 18 hari dan 22 hari. Masing-masing dilakukan dengan 5 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi teh kombucha mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan hasil yang berbeda sesuai dengan perlakuan. Analisis data menggunakan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji Least Significant Differences (LSD) menunjukkan fermentasi teh kombucha memiliki daya hambat yang signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Zona hambat maksimum yang dihasilkan fermentasi teh kombucha 22 hari sebesar 14,3 mm.

Kata Kunci : Fermentasi, Teh kombucha, *Staphylococcus aureus*, Zona hambat



ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of prolonged fermentation time of kombucha tea against *Staphylococcus aureus* growth. This study was conducted experimentally using a completely randomized design. There were 4 treatments namely 10 days fermentation of kombucha tea, 14 days, 18 days and 22 days. Each of which has conducted with 5 replicates. The results showed that kombucha tea fermentation was able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* with different results in accordance with the treatment. Data analysis using ANOVA which followed by Least Significant Differences (LSD) showed that kombucha tea fermentation presented a significant effect in inhibiting *Staphylococcus aureus* growth. The maximum inhibition zone produced by 22 days kombucha tea fermentation which was 14.3 mm.

Keywords: Fermentation, kombucha tea, *Staphylococcus aureus*, inhibitory zone



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Yang Maha Esa atas segala Rahmat dan Karunia-Nya sehingga dapat menyelesaikan Skripsi ini dengan judul “Pengaruh Peningkatan Waktu Fermentasi Teh Kombucha Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*”.

Terima kasih penulis sampaikan kepada Ibu Ida Fauziah S.Si. M.Si dan Ibu Rahmiati S.Si. M.Si selaku pembimbing I dan II serta Bapak Abdul Karim S.Si. M.Si selaku sekretaris yang telah banyak memberikan saran dan masukan. Terima kasih penulis sampaikan kepada kedua orang tua yang senantiasa memberikan doa dan dukungannya selama penyusunan skripsi ini. Ungkapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada teman-teman yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan. Penulis mengharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan dan perbaikannya sehingga skripsi ini dapat memberikan manfaat.

Penulis

(Veri Indriyani)

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| ABSTRAK..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| RIWAYAT HIDUP | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| DAFTAR ISI..... | v |
| DAFTAR GAMBAR | vii |
| DAFTAR LAMPIRAN | viii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Perumusan Masalah | 3 |
| 1.3. Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4. Hipotesis penelitian..... | 3 |
| 1.5. Manfaat Penelitian | 4 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1. Kombucha | 5 |
| 2.1.1. Sejarah..... | 5 |
| 2.1.2. Mikroorganisme Pelaku Proses Fermentasi..... | 6 |
| 2.1.3. Kandungan Teh Kombucha | 6 |
| 2.1.4. Manfaat Teh Kombucha | 7 |
| 2.1.5. Proses Fermentasi Teh Kombucha..... | 8 |
| 2.1.6. Prinsip Fermentasi Teh Kombucha..... | 10 |
| 2.1.7. Aktivasi Antibakteri..... | 11 |
| 2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> | 14 |
| 2.2.1. Taksonomi..... | 14 |
| 2.2.2. Morfologi | 15 |
| 2.2.3. Habitat | 15 |
| 2.2.4. Patogenesis dan Gambaran Klinik..... | 15 |
| | |
| BAB III METODOLOGI PENELITIAN | 18 |
| 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian | 18 |
| 3.2. Alat dan Bahan | 18 |
| 3.2.1. Alat | 18 |
| 3.2.2. Bahan | 18 |
| 3.3. Metode Penelitian | 18 |
| 3.4. Prosedur Kerja | 19 |
| 3.4.1. Preparasi Stater Kombucha..... | 19 |
| 3.4.2. Pembuatan Teh Kombucha | 19 |
| 3.4.3. Isolat Bakteri Patogen | 20 |
| 3.4.4. Pembuatan Media MHA | 20 |
| 3.4.5. Pengujian Antagonis | 20 |
| 3.8. Analisis Data | 21 |
| | |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 22 |
| 4.1. Zona Hambat Fermentasi Teh Kombucha terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> | 22 |
| | |
| BAB V SIMPULAN DAN SARAN..... | 27 |

| | |
|----------------------|----|
| 5.1. Simpulan | 27 |
| 5.2. Saran | 27 |
| DAFTAR PUSTAKA | 28 |
| LAMPIRAN..... | 30 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| 1. Diagram diameter Zona Hambat Fermentasi Teh Kombucha Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 22 |
| 2. Zona Hambat Teh Kombucha Terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |



DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| 1. Diameter Zona Hambat Fermentasi Teh Kombucha Terhadap Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> | 31 |
| 2. Analisis Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji ANOVA (<i>Analysis of Variance</i>) dilanjut LSD..... | 31 |
| 3. Dokumentasi Penelitian | |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kombucha atau dikenal masyarakat Indonesia sebagai jamur teh atau jamur dipo, adalah fermentasi teh menggunakan campuran kultur bakteri dan khamir sehingga diperoleh citarasa asam dan berbentuk lapisan nata. Kombucha telah lama dikenal di berbagai negara Eropa dan Jepang. Banyak orang menduga bahwa kombucha pertama kali dikonsumsi oleh masyarakat di daratan Cina yang sudah mengenal teh fermentasi ini sejak 3000 tahun yang lalu (Naland, 2008).

Proses fermentasi dari teh kombucha ini menghasilkan bermacam-macam senyawa penting seperti Polifenol, asam organik (asam asetat, asam glukonat, asam laktat), vitamin B kompleks, vitamin C, enzim dan antibiotik (Naland, 2008). Kandungan-kandungan tersebut dipercaya dapat memiliki efek terhadap kesehatan seperti mengatasi masalah darah tinggi atau rendah, rematik, kegemukan, arthritis, migraine, diabetes, dan lainnya. Selain itu, kandungan yang terdapat didalam kombucha sangat bermanfaat bagi tubuh manusia sehingga menjadi benteng dari serangan bakteri patogen. Kombucha juga merupakan senyawa antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, yaitu seperti bakteri *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhimurium* (Restuati, 2011).

Bakteri yang bersifat flora normal dalam tubuh manusia umumnya tidak patogen, namun pada kondisi tertentu dapat menjadi patogen oportunistik. Salah satu bakteri yang bersifat flora normal dalam tubuh manusia adalah *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif dan termasuk bakteri golongan Enterobacter. Bersifat normal dalam tubuh manusia, akan tetapi keberadaannya pada makanan merupakan suatu cemaran. Saluran pencernaan mudah terserang mikroorganisme penyebab infeksi karena saluran pencernaan merupakan pintu masuknya makanan maupun minuman yang beresiko

membawa mikroorganisme penyebab infeksi. Infeksi dapat disebabkan oleh bakteri, virus, cacing, protozoa, maupun jamur (Pajariu, 2010).

Daya antibakteri teh kombucha telah dibuktikan oleh beberapa penelitian, diantaranya adalah Rofiq (2002) yang meneliti pengaruh inhibisi teh fermentasi kombucha terhadap bakteri *Salmonella pullorum* secara *in vitro*. Hasil menunjukkan teh fermentasi kombucha memiliki daya hambat terhadap *Salmonella pullorum*. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Nurul (2010) tentang analisis kondisi dan potensi lama fermentasi medium kombucha (*Teh, kopi, Rosela*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen (*Vibrio cholerae* dan *Bacillus cereus*). Hasil menunjukkan interaksi perbedaan jenis medium dan lama fermentasi minuman kombucha mempunyai potensi daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* dan *Bacillus cereus*.

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Simanjutak (2017) mengkaji efek antibakteri kopi robusta yang difermentasikan dengan kombucha terhadap *Salmonella typhi*, hasil menunjukkan fermentasi 6, 12, dan 18 hari memiliki antibakteri terhadap *Salmonella typhi*. Zona hambat tertinggi terdapat pada waktu fermentasi 18 hari. Penelitian lain yang dilakukan oleh Aryadnyani (2012) menunjukkan peningkatan waktu fermentasi kombucha tea 6 hari, 10 hari, 14 hari, dan 18 hari dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hasil menunjukkan fermentasi *kombucha tea* yang optimal adalah selama 10 hari.

Lama waktu fermentasi akan menentukan kemampuan tumbuh suatu organisme. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sari (2010), menunjukkan bahwa proses fermentasi kombucha dipengaruhi oleh lamanya waktu fermentasi, jumlah teh, jumlah gula yang digunakan serta stater yang ditambahkan ke media teh yang akan difermentasikan. Proses fermentasi dapat menyebabkan perubahan sifat fisik dan sifat kimia yang meliputi kadar pati, kadar alkohol, pH, dan kadar antioksidan. Dari beberapa uraian diatas, maka diperlukan

kajian untuk menguji waktu paling optimal fermentasi teh kombucha terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.2. Perumusan Masalah

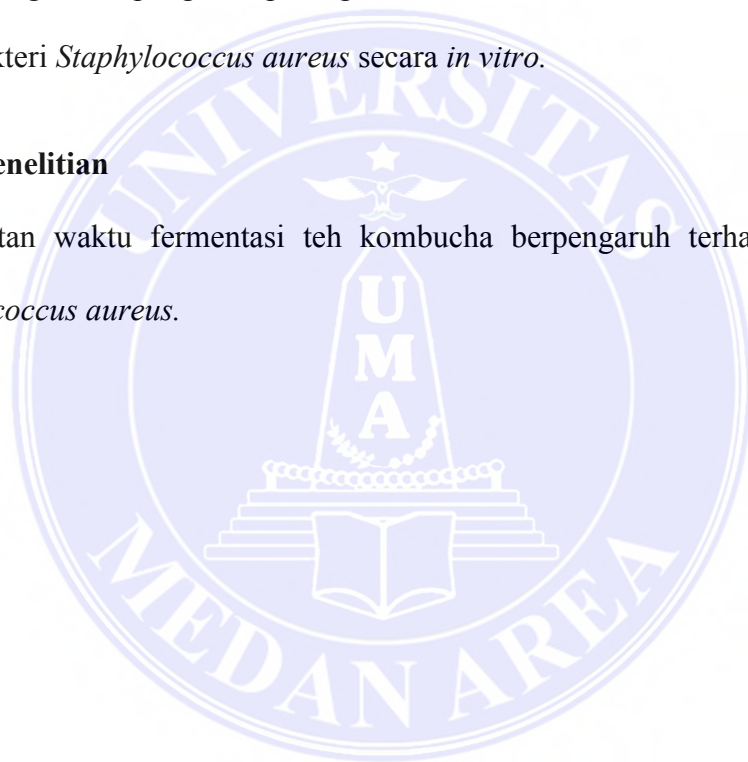
Apakah peningkatan waktu fermentasi teh kombucha mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh peningkatan waktu fermentasi teh kombucha terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4. Hipotesis Penelitian

Peningkatan waktu fermentasi teh kombucha berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.



1.5. Manfaat Penelitian

Untuk menambah pengetahuan dan pengalaman penulis tentang daya hambat teh kombucha terhadap *Staphylococcus aureus*, sebagai informasi dan menambah pengetahuan bagi masyarakat mengenai Teh Kombucha bagi kesehatan, sebagai bahan informasi dan bacaan tentang daya hambat Teh Kombucha terhadap *Staphylococcus aureus* untuk penelitian yang sama dimasa yang akan datang, sebagai bahan informasi tentang manfaat-manfaat teh kombucha dan pengaruhnya dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kombucha

2.1.1. Sejarah

Menurut Greenwalt *et al*, kombucha adalah teh fermentasi tradisional yang telah populer di Amerika Serikat sehubungan dengan efeknya bagi kesehatan. Kombucha adalah minuman teh yang sedikit manis, teh asam yang saat ini telah dikonsumsi di seluruh dunia. Kombucha dikonsumsi luas sebagai minuman yang menyehatkan karena mudah dan aman diproduksi di rumah. Kombucha atau dikenal masyarakat Indonesia sebagai jamur teh atau jamur dipo, adalah fermentasi teh menggunakan campuran kultur bakteri dan khamir sehingga diperoleh citarasa asam dan terbentuk lapisan nata. Kombucha telah lama dikenal di berbagai negara Eropa dan Jepang. Kombucha dipercaya masyarakat dapat digunakan untuk mengatasi masalah kesehatan, seperti darah tinggi atau rendah, rematik, kegemukan, arthritis, migraine, diabetes, dan lainnya (Restuati, 2011).

Banyak orang menduga bahwa kombucha pertama kali dikonsumsi oleh masyarakat di daratan Cina yang sudah mengenal teh fermentasi ini sejak 3000 tahun yang lalu. Nama kombucha berasal dari dua kata yaitu “kombu” dan ”cha”. Cha berasal dari bahasa Cina yang berarti teh sedangkan Kombu adalah nama seorang tabib Korea dari abad ke-5 masehi yang berhasil menyembuhkan kaisar Jepang yang bernama Inkyo sekitar tahun 414 SM. Kaisar menderita sembelit berkepanjangan dan disembuhkan oleh tabib dengan teh hasil fermentasi. Atas jasa tabib tersebut sang kaisar memberi nama ramuan tersebut “kombucha” yang berarti teh ramuan dari seorang tabib yang bernama Kombu (Naland, 2008).

2.1.2. Mikroorganisme Pelaku Proses Fermentasi

Kultur kombucha mengandung berbagai macam bakteri dan khamir. Jamur yang berperan dalam pembentukan kombucha termasuk golongan ragi (*yeast*) diantaranya

Saccharomyces cerevisiae, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces apiculatus* varietas, *Schizosaccharomyces bailii*, *Candida fomatata*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, dan *Z. rouxii* (Restuati, 2011). Bakteri yang berperan adalah *Acetobacter xylium*, *Xylinoides*, *Gluconicum*, *Acetobacter ketogenum*, *Pithiafermentans*, *Torula varietas* (Naland, 2008) *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Gluconobacter*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. intermedius* (Hidayat *et al.*, 2006). Kedua jenis mikroorganisme ini hidup saling bergantung dan membentuk koloni. Koloni jamur dan bakteri hidup bersimbiosis, maka sangat sulit bagi organisme patogen lain mengontaminasi kerja sama kedua jenis mikroorganisme ini. Kondisi lingkungan yang asam akibat proses fermentasi semakin mempersulit organisme asing yang tidak menghendaki lingkungan dengan kadar pH yang rendah (Naland, 2008). Kombucha menyerupai lembaran gelatin (gel) yang berwarna putih dengan ketebalan 0,3-1,2 cm dan terbungkus selaput liat. Para ahli menyebut jamur bakteri ini dengan sebutan *Symbiosis Colony of Bactery Yeast* (koloni scoby). Sifatnya yang seperti gel membuat bentuk koloni scoby mengikuti bentuk wadah (tempat pembiakan). Tumbuh pada lingkungan yang mengandung glukosa, misalnya teh manis. Koloni ini akan membentuk susunan yang berlapis-lapis yang semakin lama semakin tebal (Naland, 2008).

2.1.3. Kandungan Teh Kombucha

Selama fermentasi kultur kombucha akan menghasilkan sejumlah alkohol (0,5-1%), karbon dioksida, vitamin B kompleks (B1/tiamin, B2/riboflavin, B3/niasin *nicotinic acid*, B6/piridoksin, B12/sianokobalamin, b15), vitamin C, asam folat (citroforum factor atau leucovorin), asam glukoronat, asam asetat, asam hyaluronic (asam hyaluronidase) asam chondroitin sulfat, asam laktat (asam 2- hidroksipropanoat), senyawa mirip Acetaminophen, asam amino esensial, enzim, antibiotik dan kandungan lain seperti polifenol dan usnic acid yang berperan sebagai antivirus dan antibakteri (Hidayat *et al.*, 2006 ; Naland, 2008).

2.1.4. Manfaat Kombucha

Kombucha dipercaya masyarakat dapat digunakan untuk mengatasi masalah kesehatan seperti darah tinggi, rematik, kegemukan, arthritis, migraine, diabetes dan lainnya. 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 urin. Kandungan antimikrobia pada minuman kombucha mampu menghambat pertumbuhan *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella typhimurium* (Hidayat *et al.*, 2006). Menyatakan kombinasi asam glukoronat dan asam laktat dalam kombucha sangat efektif untuk menghancurkan mikroorganisme (bakteri, virus, dan jamur). Penelitian baru-baru pada kombucha telah membuktikan bahwa kegiatan antimicrobial berbagai mikroorganisme patogen sebagian besar disebabkan oleh asam asetat, dimana asam asetat diketahui mampu menghambat dan membunuh sejumlah bakteri gram positif dan gram negatif (Talawat *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian telah dilakukan terhadap sejumlah pemakai kombucha yang terdapat di daerah Kargasok (Rusia), Polandia, Amerika, Cina dan beberapa negara lainnya, untuk membuktikan khasiat kombucha. Penduduk Kargasok mengkonsumsi kombucha setiap hari sehingga banyak yang berumur panjang bahkan lebih dari 100 tahun. Meskipun sudah tua, mereka tetap melakukan aktifitas seperti orang yang masih produktif. Selain itu di Rusia kombucha juga digunakan untuk mengobati pecandu minuman keras. Setelah mengkonsumsi kombucha secara rutin, kebiasaan minum minuman beralkohol akan berkurang dan bahkan ditinggalkan. Efektifitas penyembuhan dari kombucha berbasis pada asam glukonat, asam glukoronat, asam laktat, asam asetat, vitamin C, vitamin B serta zat-zat antibiotik. Meskipun demikian, kombucha bukanlah obat dan tidak bisa menggantikan penggunaan obat resep dokter. Prinsipnya kombucha berperan meningkatkan derajat kesehatan dan daya tahan tubuh. Dengan meningkatnya kondisi daya tahan dan kesehatan tubuh, pencegahan dan

penyembuhan berbagai macam penyakit bisa lebih optimal. Hasil fermentasi dan oksidasi dari mikroorganisme pada kombucha menghasilkan berbagai macam asam organik, vitamin dan enzim-enzim. Beberapa khasiat dari kombucha adalah pencegah kanker, memperbaiki fungsi hati, membantu mengobati tekanan darah tinggi, pencegah stroke, pereda nyeri tenggorok, pengikis lemak dan kolesterol, penjaga stamina tubuh, menjaga kebersihan kulit wajah (Naland, 2008).

2.1.5. Proses Fermentasi Teh Kombucha

Proses fermentasi dimulai ketika kultur mengubah glukosa menjadi alkohol dan CO₂. Kemudian bereaksi dengan air membentuk asam karbonat. Alkohol akan teroksidasi menjadi asam asetat. Asam glukonat terbentuk dari oksidasi glukosa oleh bakteri dari genus *Acetobacter*. Kultur dalam waktu bersamaan juga menghasilkan asam-asam organik lainnya. Bakteri *A.xilinum* mengubah gula menjadi selulosa yang disebut nata dan melayang dipermukaan medium. Jika nutrisi dalam medium telah habis dikonsumsi, kultur akan berhenti tumbuh tetapi tidak mati. Kultur akan aktif lagi jika memperoleh nutrisi kembali. Lama fermentasi berkisar 4-14 hari. Semakin lama fermentasi maka akan semakin asam dan rasa manis semakin berkurang. Lama fermentasi yang disarankan adalah 14 hari karena gula telah benar-benar difermentasi dan minuman memiliki rasa yang kuat seperti anggur. Pada fermentasi 10 hari, dengan kadar gula awal 8%, akan diperoleh fruktosa 25 g/L, asam glukonat 3,1 g/L, dan asam asetat 2 g/L. Jika fermentasi diperpanjang menjadi 14 hari, maka fruktosa menjadi 15,03 g/L, asam glukonat 6,64 g/L dan asam asetat 8,61 g/L. Kombucha selain dibuat dari teh juga dapat dibuat dari berbagai bahan baku seperti apel, wortel, dan sebagainya jika akan digunakan untuk minuman atau dari limbah pertanian seperti limbah cair tahu, tempe dan tapioca jika akan digunakan untuk produksi selulosa (Restuati, 2011).

Perubahan mikrobial dan biokimia yang terjadi pada kombucha adalah sebagai berikut :

- a. Pertumbuhan khamir dan bakteri

Selama waktu inkubasi (6-14 hari) jumlah khamir hidup lebih meningkat. Walaupun jumlah sel akhir tetap tinggi namun jumlahnya akan terus menurun jika fermentasi dilanjutkan. Konsentrasi sel khamir dalam cairan umumnya lebih tinggi daripada yang terdapat dalam pelikel. Dalam pertumbuhan di PDA terdapat dua tipe koloni. Hal ini menunjukkan adanya dua tipe khamir yang terdapat pada kombucha. Hasil serupa juga terjadi pada bakteri asam asetat yang menunjukkan jumlah dalam larutan lebih tinggi daripada dalam pelikel (Restuati, 2011).

b. Perubahan kandungan gula

Konsentrasi sukrosa menurun secara linier dengan waktu selama 30 hari diikuti dengan penurunan yang lebih lambat. Rerata konsentrasi glukosa meningkat dan mencapai konsentrasi tertinggi (1,2%) setelah 30 hari. Dengan kata lain, konsentrasi fruktosa meningkat selama periode fermentasi, dan mencapai 5,5% pada 30 hari fermentasi (Hidayat *et al.*, 2006).

c. Produksi etanol

Perubahan konsentrasi etanol yang terdapat dalam kombucha selama fermentasi menunjukkan peningkatan pada masa awal fermentasi, yang mencapai 0,55% pada 20 hari fermentasi kemudian turun sampai akhir fermentasi (Hidayat *et al.*, 2006).

d. Perubahan asam Organik

Produksi asam organik menunjukkan peningkatan selama fermentasi dan mencapai 1,1 g/100 ml yang dicapai pada fermentasi 30 hari, yang kemudian turun menjadi 0,8 g/100 ml pada 60 hari fermentasi. Asam glukonat dan asam organik lain juga ditemukan setelah 6 hari fermentasi dan mencapai 3,9 g/100 ml pada akhir fermentasi (Hidayat *et al.*, 2006). Kadar *succinic acid* dan *gluconic acid* meningkat seiring dengan lama fermentasi. Demikian juga dengan daya antibakteri terhadap *V. cholera*, *S. typhi* dan *P. aeruginosa* meningkat dengan peningkatan waktu fermentasi (Talawat *et al.*, 2006).

2.1.6. Prinsip Fermentasi Teh Kombucha

Pada prinsipnya, ada tiga faktor penting dalam pembuatan teh kombucha. Pertama adalah koloni jamur – bakteri yang disebut “koloni scoby” atau koloni kombucha. Organisme inilah yang merupakan kunci terjadinya proses fermentasi. Kedua adalah media hidup koloni yang berupa larutan teh bergula (glukosa). Fungsi larutan ini adalah menyediakan sumber energi atau makanan bagi koloni jamur – bakteri dalam melangsungkan kehidupannya. Ketiga adalah kondisi lingkungan. Proses fermentasi memerlukan lingkungan udara dengan kandungan oksigen rendah. Demikian juga dengan suhu dan kelembapan. Suhu terlalu tinggi menyebabkan organisme pelaku fermentasi tidak bisa menjalankan perannya dengan baik (Naland, 2008).

2.1.7. Aktivitas Antibakteri

Antibakteri adalah suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri. Antibakteri diukur secara *in vitro* untuk menentukan potensi agen bakteri dalam larutan, konsentrasinya dalam cairan tubuh atau jaringan, dan kerentanan bakteri tertentu terhadap senyawa dengan konsentrasi tertentu (Gunawan, dkk, 2004). Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada zat yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai bakteriostatik dan yang bersifat membunuh bakteri yang dikenal sebagai bakterisida (Pelczar dan Chan, 2005). Mekanisme kerja antibakteri :

a. Kerusakan pada dinding sel

Kerusakan dinding sel oleh antimikroba menyebabkan terjadinya lisis, efek kerusakan lainnya yaitu terbentuknya protoplast. Protoplast merupakan susunan sel tanpa dinding dan bersifat lebih rentan mengalami lisis (Pelczar dan Chan, 2005).

b. Perubahan permeabilitas sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan–bahan tertentu didalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan-bahan lain. Membran memelihara integritas komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 2005).

c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi dan ireversibel (tidak dapat balik) komponen – komponen seluler yang vital (Pelczar dan Chan, 2005).

d. Penghambatan kerja enzim

Setiap enzim yang ada didalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 2005).

e. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan penting didalam proses kehidupan normal sel. Hal itu berarti bahwa gangguan apa pun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat – zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelczar dan Chan, 2005).

Metode pengujian antibakteri suatu zat yang sering digunakan diantaranya metode difusi. Metode difusi terbagi atas beberapa test dengan metode *disc diffusion* menurut tes Kirby & Bauer, metode *disc diffusion* untuk menentukan efektivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan

media agar. Metode E-test digunakan untuk mengestimasi MIC (*minimum inhibitory concentration*) atau KHM (kadar hambat minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme (Harmita dan Radji, 2006)

Penelitian Greenwalt et. al., (1998) membuktikan bahwa aktifitas antibakteri pada kombucha melawan mikroorganisme patogenik sebagian besar dikontribusikan oleh zat asam yang terkandung dalam kombucha. Hal ini dapat diketahui dengan uji yang dilakukan pada mikroorganisme yang mengalami penghambatan yang sama, tetapi pada saat sampel teh kombucha dinetralkan, aktifitas antibakteri ini menghilang. Oleh karena itu, aktifitas antibakteri ini kemungkinan besar dikontribusikan oleh keasaman teh kombucha. Kombucha mengandung 7 g/l (0,7%) asam asetat. Asam asetat pada kombucha memiliki aktifitas antibakteri secara invitro melawan *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerasius*, dan *Agrobacterium tomefficiens*. Secara umum pada proses fermentasi kombucha terjadi simbiosis antara bakteri *Acetobacter xylinum* dan khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Simbiosis ini menghasilkan zat asam dan alkohol yang menghalangi pertumbuhan mikroorganisme asing yang tidak berasal dari jamur teh kombucha.

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan nama spesies yang merupakan bagian dari genus *Staphylococcus*. Bakteri ini pertama kali diamati dan dibiakan oleh Pasteur dan Koch, kemudian diteliti secara lebih terinci oleh Ogston dan Rosenbach pada era tahun 1880-an. Nama genus *Staphylococcus* diberikan oleh Ogston karena bakteri ini pada pengamatan mikroskopis berbentuk seperti setangkai buah anggur, sedangkan nama spesies *aureus* diberikan oleh Rosenbach karena pada biakan murni, koloni bakteri ini terlihat berwarna kuning-keemasan. Rosenbach juga mengungkapkan bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan penyebab infeksi pada luka dan furunkel. Habitat alami *Staphylococcus aureus* pada manusia adalah di daerah kulit, hidung, mulut, dan usus besar. Ada strain dimana pada keadaan sistem imun yang normal *Staphylococcus aureus* tidak bersifat patogen (mikroflora normal manusia) (Jawetz, 2008).

2.2.1. Taksonomi

Taksonomi *Staphylococcus aureus* menurut Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology (2009) :

Divisio : Firmicutes
Class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Family : Staphylococcaceae
Genus : Stapylococcus
Spesies : *Staphylococcus aureus*.

2.2.2. Morfologi

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram positif yang menghasilkan pigmen kuning, bersifat aerob dan anaerob fakultatif, tidak menghasilkan spora, meragikan laktosa, tes katalase positif dan tahan hidup dalam lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi (halofilik), tidak ada motil, umumnya tumbuh berpasangan maupun berkelompok dengan diameter sekitar 0,8 – 1,0 μm , suhu optimal 37°C. *Staphylococcus aureus* mengandung polisakarida dan protein berfungsi sebagai antigen dan merupakan substansi penting didalam struktur dinding sel (Elliot , et al 2009).

2.2.3 Habitat

Habitat *Staphylococcus aureus* secara alami pada manusia adalah di daerah kulit, hidung, mulut, dan usus besar. *Staphylococcus aureus* adalah mikrobiota yang sering dapat ditemukan di daerah kulit, hidung. Tapi hidung lah yang biasanya dianggap tempat berkembangnya kolonisasinya. Biasanya bersifat tidak patogen dalam tubuh tapi ada kalanya dapat menyebabkan infeksi dan sakit parah sehingga bakteri tersebut resisten terhadap antibiotik. Beberapa diantaranya tergolong flora normal pada kulit dan selaput mukosa manusia, menyebabkan penanahan, abses, berbagai infeksi piogen, dan bahkan septikimia yang fatal (Jawetz, 2008).

2.2.4. Patogenesis dan Gambaran Klinik

Sebagian besar bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, saluran pencernaan makanan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. *Staphylococcus aureus* yang patogen bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulasi, dan mampu meragikan manitol (Jawetz, 2008).

Infeksi oleh *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus*

adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis dan endokarditis. *Staphylococcus aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan syndroma syok toksik (Sjoekoer, 2005).

Diantaranya adalah sebagai berikut :

a. Bisul

Bisul atau abses setempat, seperti jerawat dan borok merupakan infeksi kulit di daerah folikel rambut, kelenjar sebace, atau kelenjar keringat. Mula-mula terjadi nekrosis jaringan setempat, lalu terjadi koagulasi fibrin di sekitar lesi dan pembuluh getah bening, sehingga terbentuk dinding yang membatasi proses nekrosis. Infeksi dapat menyebar ke bagian tubuh lain melalui pembuluh getah bening dan pembuluh darah, sehingga terjadi peradangan pada vena, trombosis, bahkan bakterimia. Bakterimia dapat menyebabkan terjadinya endokarditis, osteomielitis akut hematogen, meningitis atau infeksi paru-paru (Sjoekoer, 2005).

b. Kontaminasi Langsung

Staphylococcus aureus pada luka terbuka (seperti luka pasca bedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosokomial (Sjoekoer, 2005).

c. Keracunan Makanan

Keracunan makanan dapat disebabkan oleh kontaminasi enterotoksin dari *Staphylococcus aureus*. Waktu onset dari gejala keracunan biasanya cepat dan akut, tergantung pada daya tahan tubuh dan banyaknya toksin yang termakan. Jumlah toksin yang dapat menyebabkan keracunan adalah 1,0 µg/gr makanan. Gejala keracunan ditandai oleh rasa mual, muntah-muntah, dan diare yang hebat tanpa disertai demam (Sjoekoer, 2005).

d. Syndroma Syok Toksik (SST)

Syndroma syok toksik (SST) pada infeksi *Staphylococcus aureus* timbul secara tiba-tiba dengan gejala demam tinggi, muntah, diare, mialgia, ruam, dan hipotensi, dengan gagal jantung dan ginjal pada kasus yang berat. SST sering terjadi dalam lima hari permulaan haid pada wanita muda yang menggunakan tampon, atau pada anak-anak dan pria dengan luka yang terinfeksi *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* dapat diisolasi dari vagina, tampon, luka atau infeksi lokal lainnya, tetapi praktis tidak ditemukan dalam aliran darah (Sjoekoer, 2005).



BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai dengan bulan Juni 2018 di Laboratorium Kesehatan Daerah Jl. Williem Iskandar No. 4, Medan.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kompor gas, toples kaca, saringan teh, kain kasa penutup toples, karet gelang, auto clave, labu erlenmeyer, hotplate, tangkai pengaduk, Mikropipet dan tip, cotton swab steril, neraca digital, beaker glass, petridisk, tabung reaksi dan rak tabung, kapas, pinset, dan jangka sorong.

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Starter Kombucha, teh, gula pasir, isolat bakteri *Staphylococcus aureus*, akuades steril, media Mueller Hinton Agar (MHA), *blank disc*.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 kali perlakuan pada fermentasi ke 10 hari, 14 hari, 18 hari, dan 22 hari dengan ulangan unit eksperimen sebanyak 5 kali setiap perlakuan. Parameter yang diamati adalah diameter zona hambat yang terbentuk oleh masing masing waktu fermentasi kombucha.

3.4. Prosedur Kerja

3.4.1. Peremajaan Stater Kombucha

Stater kombucha diperoleh dari Tirta Ning Nusantara Jln. Gede Desa II No. 5, Bali. Pemeliharaan stater kombucha dilakukan dengan cara menempatkannya dalam wadah kaca yang sudah dicuci bersih menggunakan air minum. Perlu dipastikan tidak ada kotoran yang menempel pada starter kombucha. Stater kombucha dimasukkan ke dalam wadah kaca, diberi teh kombucha dan teh manis yang sudah dingin. Selanjutnya, wadah kaca ditutup menggunakan kain kasa dan disimpan dalam suhu ruangan (Nuraini, 2017).

3.4.2. Pembuatan Teh Kombucha (Hidayat et, al., 2006)

Pembuatan teh kombucha dilakukan dengan cara menuangkan 30 gr teh ke dalam wadah kaca atau *stainless steel* yang sudah berisi dua liter air, kemudian direbus sampai mendidih dan biarkan sekitar 15 menit hingga teh larut. Teh disaring menggunakan penyaringan kain, kemudian menambahkan 250 gr gula dan aduk sampai larut. Teh dimasukkan ke dalam wadah kaca atau *stainless steel* yang bersih. Setelah teh dingin, ditambahkan Stater Kombucha dan cairan induk yang berasal dari fermentasi sebelumnya sebanyak 10 %. Bagian atas wadah ditutup dengan kain kasa yang diikat dengan karet gelang untuk memberikan oksigen dalam jumlah kecil (mikroaerofilik), Selanjutnya di inkubasi selama 10 hari (percobaan 1), 14 hari (percobaan 2), 18 hari (percobaan 3), 22 hari (percobaan 4) dalam suhu ruangan. Suhu optimal 23-27°C, terhindar dari sinar matahari serta bebas guncangan/getaran.

3.4.3. Isolat Bakteri Patogen

Isolat murni *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Daerah Medan dan dikultur pada media *Muller Hinton Agar* (MHA). Isolat diinokulasi pada suhu 25-30°C dan di simpan untuk selanjutnya digunakan kembali.

3.4.4. Pembuatan Media MHA – *Staphylococcus aureus*

Pembuatan media MHA (Muller Hinton Agar) dilakukan dengan cara media MHA ditimbang sebanyak 3,4 gram, kemudian ditambahkan 100 ml akuadest. Suspensi media di homogenkan dan dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih. Kemudian media disterilkan dengan menggunakan autoklaf suhu 121°C tekanan 2 ATM selama 15 menit. Media yang sudah steril, disimpan di lemari pendingin untuk digunakan selanjutnya.

3.4.5. Pengujian Antagonis Kombucha Tea Dengan *Staphylococcus aureus*

Pengujian Antagonis Kombucha Tea dengan *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara menyiapkan media uji berupa MHA Steril. Kemudian, menuangkan ke dalam cawan petri secara aseptis dan dibiarkan memadat. suspensi bakteri patogen dibuat dengan kerapatan sel setara 10^8 CFU atau setara dengan standar Mc Farland. Cotton swab steril diambil dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri patogen, lalu dioles merata pada permukaan media. Kombucha disiapkan sesuai perlakuan (10 hari, 14 hari, 18 hari, dan 22 hari). Cairan kombucha dengan variasi waktu fermentasi masing-masing diteteskan sebanyak 10 µL pada permukaan blank disc. Blank disc ditanam pada media MHA berisi suspensi dan diinkubasi selama 24 jam. Diamati zona hambat yang muncul, kemudian diukur dengan jangka sorong.

3.5. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian adalah diameter zona hambat masing-masing perlakuan teh kombucha terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan empat perlakuan dan lima ulangan.

Uji hipotesis dilakukan dengan analisis sidik ragam atau ANOVA dilanjutkan dengan uji Least Significant Differences (LSD) untuk mengetahui peningkatan waktu terbaik fermentasi teh kombucha dalam mempengaruhi pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.



DAFTAR PUSTAKA

- Aryadnyani, NP. 2012. *Peningkatan Waktu Fermentasi Kombucha Tea Meningkatkan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) Secara In Vitro*. Tesis Universitas Udayana Denpasar.
- Andriani, Darmono and Widya Kurniawati. 2007. Pengaruh Asam Asetat Dan Asam Laktat Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Salmonella Sp* Yang Diisolasi Dari Karkas Ayam. Jurnal Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner.
- Bergey, DH. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Departement of Microbiology 527 Biological Sciences Building University of Georgia Athens, USA.
- Elliot Tom, *et al.* 2009. *Mikrobiologi Kedokteran & Infeksi*. Edisi 4. Jakarta : EGC.
- Effendi ,F., Roswiem,A.P., and Stefani,E. 2010. Uji Aktivitas Anti Bakteri Teh Kombucha Probiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Jurnal Program studi Farmasi Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor.
- Greenwalt, C.J., Ledford, R.A., and Steinkraus, K.H. t.t. 1998. *Determination and Characterization of The Anti-Microbial Activity of The Fermented Tea Kombucha*. Departement of Food Science Cornell University Ithaca, New York.
- Gunawan, D., S. Mulyani. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi)* Jilid 1. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Harmita, DR dan Radji M. 2006. *Buku Ajar Analisis Hayati*. Jakarta : EGC.
- Hidayat, N., Padaga, M.C., and Suharsini, S. 2006. *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi Yogyakarta, p. 105-09.
- Jawetz, Melnick and Adelberg, 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 23. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kumalasari, G.A. 2010. Optimasi waktu inkubasi pada fermentasi teh rosela (*Hibiscus sabdariffa L.*) dengan inokulum kultur kombucha dan pengaruhnya terhadap kadar asam laktat dan asam asetat. Available from URL : <http://gita-acil20.blogspot.com/2010/12/coba.html>. [Accessed 18 November 2017]
- M. Dzen Sjoekoer dkk, 2005. *Bakteriologi Medic*, Bayumedia, Malang.
- Naland, H. 2008. *Kombucha Teh Dengan Seribu Khasiat*. Agromedia Pustaka. Jakarta, p. 2-58.
- Nurul, A. 2010. "Analisis Kondisi dan Potensi Lama Fermentasi Medium Kombucha (The, Kopi, Rosela) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri Patogen (*Vibrio cholerae* dan *Bacillus cereus*)" (Skripsi). Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nuraini, DN. 2017. *Pro - Kontra Aneka Minuman Bagi Kesehatan*. Cetakan I. : Yogyakarta : Penerbit Gava Media.

- Pajariu, A.2010. *Infeksi Oleh Bakteri Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) di RSUP Dr.Kariadi Semarang*. Artikel Ilmiah. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Pelczar M J, dan Chan S. 2005. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta : UI Press.
- Restuati, Dewi. 2011. *Mikrobiologi Industri*. Unimed. Medan, p. 99 - 101
- Rofiq, M.N. 2002. *Pengaruh Inhibisi Teh Fermentasi Kombucha terhadap Bakteri Salmonella pullorum Secara Invitro*. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. 4(5): 186 - 189. HumasBPPT/ANY.
<http://www.iptek.net.id/ind/?mnu=8&ch=jsti&id=302>
- Simanjuntak, D R J. 2017. “*Efek Antibakteri Kopi Robusta Yang Difermentasikan Dengan Kombucha Terhadap Salmonella thypi*” (Skripsi). Universitas Lampung.
- Sudjana, S.H. 1994. *Desain dan Analisa Experimen*. Edisi III, Tarsito, Bandung.
- Susanto, D., Sudrajat dan Ruga. 2012. Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (*Shorea leprosula* Miq) Sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *Jurnal Mulawarman Scientifie*. Vol. 11(2): 181-190.
- Surono. 2011. “Optimasi Konsentrasi Kopi dan Gula dalam Pembuatan Minuman Kombucha Kopi (*coffe robusta*)” (Skripsi). (Serial online) Available from URL : elibrary.ub.ac.id/.../optimasi-konsentrasi-kopi-dangula. Accessed june, 2018.
- Talawat, S., Ahantharik, P., Laohawiwattanakul, S., Premasuk, A., and Ratanapo, S.2006. *Efficacy of Fermented Teas in Antibacterial Activity*. *Departement of Biochemistry*. Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci)* 40: 925-33.