

ARTIKEL

SKRINING FITOKIMIA DAN POTENSI PROBIOTIK KOMBUCHA DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) DAN KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan*) SERTA AKTIVITAS ANTIMIKROBA PADA BAKTERI PATOGEN SALURAN CERNA

[*Phytochemical Screening and Probiotic Potential of Kombucha From Soursop Leaves (Annona muricata) and Secang Wood (Caesalpinia sappan) and Antimicrobial Activity on Pathogenic Bacteria of The Gastrointestinal Tract*]

Putu Rima Sintyadewi^{1*}, I Gusti Agung Yogi Rabani¹, Ida Ayu Putu Ary Widnyani¹, Nadya Treesna Wulansari¹, Putu Indrayoni²

¹Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi, Institut Teknologi dan Kesehatan Bali, Jalan Tukad Balian No 180 Renon, Denpasar, Bali, Indonesia.

²Program Studi Farmasi Klinik dan Komunitas, Fakultas Kesehatan, Institut Teknologi dan Kesehatan Bali, Jalan Tukad Balian No 180 Renon, Denpasar, Bali, Indonesia.

ABSTRAK

Tren hidup sehat semakin mendorong masyarakat untuk mengonsumsi pangan fungsional, khususnya minuman hasil fermentasi yang kaya senyawa bioaktif serta probiotik. Kombucha merupakan salah satu minuman yang banyak diminati karena mengandung asam organik, antioksidan, dan mikroorganisme bermanfaat bagi kesehatan. Indonesia sendiri memiliki beragam tanaman herbal, termasuk daun sirsak (*Annona muricata*) dan kayu secang (*Caesalpinia sappan*), yang dikenal memiliki aktivitas farmakologis yang kuat. Penggunaan dua bahan tersebut dalam pembuatan kombucha berpotensi menghasilkan efek bioaktif yang lebih optimal. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis profil fitokimia, total Bakteri Asam Laktat (BAL) dan yeast, aktivitas antimikroba, serta penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada minuman kombucha daun sirsak dan kayu secang. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua faktorial yaitu variasi konsentrasi daun sirsak dan kayu secang yaitu, P1 (90%:10%), P2 (80%:20%), P3 (70%:30%) dan waktu fermentasi D1 (0 hari), D2 (4 hari), D3 (8 hari), D4 (12 hari). Data dianalisis menggunakan ANOVA dan DMRT pada taraf signifikansi $p < 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi konsentrasi daun sirsak dan kayu secang pada kombucha memberikan pengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap aktivitas antibakteri *E. coli* dan *S. aureus* pada kombucha daun sirsak dan kayu secang. Formulasi P3D3 dengan komposisi 70% daun sirsak dan 30% kayu secang yang difermentasi selama 8 hari disimpulkan sebagai formulasi terbaik, yaitu berpotensi sebagai minuman probiotik dengan total BAL dan yeast masing-masing sebesar $2,0 \times 10^6$ CFU/mL dan $3,2 \times 10^6$ CFU/mL, aktivitas antimikroba tertinggi dengan zona hambat terhadap *E. coli* dan *S. aureus* masing-masing 12,7 mm dan 15,7 mm, dengan KHM terhadap *E. coli* dan *S. aureus* adalah 40% dan 20%. Skrining fitokimia kombucha daun sirsak dan kayu secang menunjukkan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, steroid dan saponin yang diduga kuat berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri.

Kata Kunci: kombucha, probiotik, daun sirsak, kayu secang, antibakteri

ABSTRACT

The healthy lifestyle trend encourages people to consume functional foods, especially fermented beverages rich in bioactive compounds and probiotics. Kombucha is one of the most popular beverages due to its organic acids, antioxidants, and beneficial microorganisms. Indonesia has a variety of herbal plants, including soursop leaves (*Annona muricata*) and sappanwood (*Caesalpinia sappan*), both known for their potential pharmacological activity. The use of these two ingredients in making kombucha has the potential to produce more optimal bioactive effects. This study aims to analyze the phytochemical profile, total LAB and yeast, and antimicrobial activity, as well as MIC values of soursop leaf and sappanwood kombucha drinks. The research used a two-factorial Completely Randomized Design (CRD) with a variety concentration of soursop leaves and sappan wood, namely, P1 (90%:10%), P2 (80%:20%), P3 (70%:30%), and fermentation times of D1 (0 days), D2 (4 days), D3 (8 days), and D4 (12 days). Data were analyzed using ANOVA and DMRT at the $p < 0.05$ significance level. The results showed that the kombucha formulation had a significant effect ($p < 0.05$) on the antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. The P3D3 formulation with a composition of 70% soursop leaves and 30% sappanwood fermented for 8 days was the best formulation with the potential as a probiotic drink with total lactic acid bacteria (LAB) and yeast of 2.0×10^6 CFU/mL and 3.2×10^6 CFU/mL, respectively, the highest antimicrobial activity with an inhibition zone of 12.7 mm against *E. coli* and 15.7 mm against *S. aureus*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values against *E. coli* and *S. aureus* were 40% and 20%, respectively. Phytochemical screening of soursop leaf and sappanwood kombucha revealed the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, phenols, steroids, and saponins, which may contribute to antibacterial activity.

Keywords: kombucha, probiotic, soursop leaves, sappanwood, antibacterial

PENDAHULUAN

Kombucha merupakan minuman fermentasi yang dihasilkan melalui aktivitas mikroorganisme simbiotik bakteri dan yeast. Kombucha dikenal sebagai minuman probiotik karena mengandung mikroorganisme hidup yang mampu memberikan manfaat kesehatan, khususnya bagi sistem pencernaan. Konsorsium bakteri asam laktat (BAL) dan yeast selama fermentasi tidak hanya dapat meningkatkan kualitas probiotik dari minuman kombucha, tetapi juga menghasilkan berbagai senyawa metabolit seperti asam organik, enzim dan komponen bioaktif yang berperan dalam aktivitas antimikroba. Produk hasil fermentasi ini berpotensi menekan pertumbuhan bakteri patogen, sehingga kombucha menjadi salah satu alternatif minuman fungsional yang aman dan bermanfaat bagi kesehatan saluran cerna (Jayabalan *et al.*, 2014; Bhattacharya *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian melaporkan, fermentasi kombucha mampu meningkatkan kandungan senyawa bioaktif dari substrat tumbuhan akibat aktivitas konsorsium mikroba dalam medium. Yeast terlebih dahulu menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, kemudian mengubahnya menjadi etanol yang selanjutnya dimanfaatkan oleh BAL yang mengubahnya menjadi asam-asam organik seperti asam laktat, asam asetat, asam glukonat dan asam malat. Akumulasi senyawa metabolit tersebut selama fermentasi menyebabkan bertambahnya total senyawa bioaktif yang berkontribusi pada aktivitas antioksidan dan antibakteri dari kombucha (Vorha *et al.*, 2019; Sinyadewi *et al.*, 2023; Sinyadewi *et al.*, 2024).

Formulasi kombucha menggunakan bahan alami seperti daun sirsak dan kayu secang merupakan salah satu inovasi yang memiliki potensi tinggi. Daun sirsak (*Annona muricata*) memiliki kandungan asetogenin, flavonoid, dan tanin yang berfungsi sebagai antimikroba dan antioksidan. (Moghadamtousi *et al.*, 2015; Fibonacci *et al.*, 2023). Disisi lain, kayu secang (*Caesalpinia sappan*) banyak mengandung senyawa brazilin dan brazilein yang telah terbukti memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Nuraeni *et al.*, 2024). Kandungan senyawa bioaktif dari kedua bahan tersebut dapat mendukung pertumbuhan BAL serta menciptakan sinergi antara BAL dan yeast dalam memproduksi metabolit antimikroba selama fermentasi.

Populasi bakteri asam laktat (BAL) dalam kombucha berperan penting bagi kesehatan saluran pencernaan. BAL mampu menyeimbangkan mikrobiota usus melalui kolonisasi dan kompetisi biologis dengan bakteri patogen melalui mekanisme produksi asam laktat, asam asetat, dan bakteriosin yang dapat menurunkan pH lumen usus sehingga menciptakan lingkungan yang tidak menguntungkan bagi patogen seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, namun tetap

mendukung pertumbuhan mikroba menguntungkan (Bhattacharya *et al.*, 2016). Selain itu, keberadaan BAL terbukti meningkatkan integritas mukosa usus dengan merangsang produksi mukus dan memperkuat *tight junction*, sehingga mengurangi risiko inflamasi dan infeksi pada saluran cerna (Ferris *et al.*, 2025). Keberadaan populasi BAL dalam kombucha juga dikaitkan dengan peningkatan pencernaan laktosa, penyerapan nutrisi, serta modulasi respon imun lokal saluran pencernaan (Zheng *et al.*, 2023). Oleh karena itu, peningkatan populasi BAL selama fermentasi kombucha menjadi faktor kunci untuk menghasilkan minuman probiotik yang mampu berkontribusi nyata terhadap kesehatan sistem pencernaan.

Sejumlah penelitian telah melaporkan aktivitas antibakteri kombucha dari berbagai bahan baku, termasuk pemanfaatan daun sirsak atau kayu secang sebagai sumber senyawa bioaktif. Namun, penelitian yang telah dilakukan sebagian besar masih terbatas pada penggunaan ekstrak tunggal daun sirsak atau kayu secang, bukan pada formulasi keduanya secara bersamaan dalam media fermentasi kombucha. Selain itu, banyak penelitian hanya berfokus pada parameter kimia atau aktivitas antioksidan, tanpa mengamati aspek mikrobiologis secara menyeluruh. Evaluasi yang menghubungkan dinamika pertumbuhan BAL dengan aktivitas antibakteri terhadap patogen saluran cerna selama proses fermentasi juga masih jarang dilakukan. Dengan demikian, penelitian mengenai kombinasi daun sirsak dan kayu secang dalam produksi kombucha, melalui identifikasi senyawa bioaktif serta analisis korelasi antara peningkatan populasi BAL dan aktivitas antibakteri dalam rentang waktu fermentasi, masih menjadi peluang riset yang signifikan untuk dikembangkan.

Fermentasi kombucha daun sirsak dan kayu secang diharapkan mampu menghasilkan minuman probiotik dengan kandungan bakteri asam laktat yang tinggi serta aktivitas antibakteri yang optimal. Kehadiran BAL yang mampu berkolonisasi di saluran pencernaan berperan penting dalam menjaga keseimbangan mikrobiota usus melalui mekanisme kompetisi nutrisi, produksi asam organik, serta sekresi berbagai metabolit antimikroba yang mampu menekan pertumbuhan bakteri patogen. Dengan demikian, kombinasi kedua bahan herbal tersebut dalam proses fermentasi tidak hanya potensial meningkatkan kualitas probiotik kombucha, tetapi juga memperkuat sifat fungsionalnya dalam mendukung kesehatan usus dan memberikan perlindungan terhadap infeksi mikroorganisme penyebab penyakit.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan penelitian meliputi daun sirsak, kayu secang, *Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast* (SCOBY), strain *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., aquades, alkohol, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), *de Man Rogosa*, *Sharpe Agar* (MRSA), FeCl₃ 5%, FeCl₃ 1%, H₂SO₄, HCl, serbuk magnesium (Mg), NaOH, asam asetat anhidrat, pereaksi Mayer, *chloramphenicol*, kertas cakram, Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktorial. Faktor pertama adalah formulasi kombucha dengan variasi konsentrasi daun sirsak dan kayu secang yang terdiri dari tiga perlakuan yaitu: 90% daun sirsak: 10% kayu secang (P1), 80% daun sirsak: 20% kayu secang (P2), 70% daun sirsak : 30% kayu secang (P3). Faktor kedua adalah lama waktu fermentasi yang terdiri dari empat taraf perlakuan yaitu: 0 hari (D1), 4 hari (D2), 8 hari (D3), 12 hari (D4).

Pembuatan Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang

Satu liter air dipanaskan selama 15 menit pada suhu 90°C, selanjutnya ditambahkan 10% (b/v) gula pasir sampai larut, dan 2,5% (b/v) formulasi daun sirsak dan kayu secang, dan diaduk selama 5 menit. Sediaan disaring kedalam toples steril dan ditambahkan air matang hingga 1 liter. Seduhan didinginkan sampai suhu 30°C, selanjutnya lembaran SCOBY yang diperoleh dari Wiki Kombucha Bali 10% (b/v) dimasukkan kedalam toples, kemudian ditutup dengan kain serbet steril dan diikat (Kallel *et al.*, 2012). Kombucha di fermentasi selama waktu perlakuan dan di panen dengan memisahkan selulosa yang terbentuk dengan media fermentasi untuk selanjutnya dilakukan pengujian meliputi skrining fitokimia, uji total BAL dan Yeast, uji aktivitas antibakteri dan uji nilai KHM.



Gambar 1. Daun Sirsak, Kayu Secang dan Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang (*Soursop Leaves, Secang Wood and Kombucha Soursop Leaves and Secang Wood*).

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia meliputi identifikasi senyawa fenol, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan alkaloid (Kandhasamy & Arunachalam, 2020).

Uji Fenolik

Sebanyak 1 mL sampel minuman probiotik ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Munculnya warna hijau atau biru menandakan keberadaan senyawa fenolik dalam sampel.

Uji Flavonoid

Sebanyak 7 mL sampel dibagi rata ke dalam tiga tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 5 mL H_2SO_4 pekat, tabung kedua diberi 5 mL HCl pekat dan serbuk magnesium (Mg), sedangkan tabung ketiga ditambahkan 5 mL larutan NaOH. Perubahan warna menjadi merah, kuning, atau jingga menjadi indikator keberadaan senyawa flavonoid.

Uji Tanin

Sebanyak 1 mL sampel minuman probiotik dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2–3 tetes larutan FeCl_3 1%. Adanya tanin ditunjukkan oleh perubahan warna campuran menjadi hijau gelap atau kehitaman.

Uji Saponin

Sampel minuman probiotik dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air panas. Setelah didinginkan, sampel dikocok selama 10 detik, lalu diteteskan 1 tetes HCl 2N dan diamati kembali. Terbentuknya busa yang stabil selama sekitar 10 menit menunjukkan hasil positif untuk saponin.

Suji Steroid

Sebanyak 1 mL sampel ditempatkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2–3 tetes asam asetat anhidrat dan diaduk perlahan hingga hampir kering. Selanjutnya 1–2 tetes asam sulfat pekat ditambahkan. Perubahan warna dari hijau ke biru menandakan adanya senyawa steroid.

Uji Alkaloid

Sampel minuman probiotik dicampurkan dengan larutan HCl 2N dan air suling, lalu dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit. Setelah didinginkan dan disaring, tiga tetes filtrat dicampur dengan dua tetes pereaksi Mayer. Endapan berwarna kuning mengindikasikan keberadaan alkaloid.

Pengujian Total BAL dan Yeast

Sampel diencerkan hingga mencapai konsentrasi 10^{-10} menggunakan larutan NaCl fisiologis. Satu mL hasil pengenceran diinokulasikan pada media SDA yang mengandung *khloramfenikol* untuk menghitung total yeast, serta pada media MRSA untuk enumerasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dengan teknik *spread plate*. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, secara aerob untuk perhitungan total yeast dan secara anaerob untuk BAL. Koloni yang muncul selanjutnya dihitung menggunakan *colony counter*. Jumlah koloni yang dianggap valid mengacu pada standar International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2007), yaitu berada dalam rentang 30–300 koloni per cawan.

Pengujian Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar Kirby–Bauer terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella* sp. Prosedur dimulai dengan peremajaan isolat bakteri uji dalam 10 mL larutan garam fisiologis, kemudian kekeruhannya disesuaikan dengan standar McFarland 0,5. Setelah itu, media NA dituangkan ke dalam cawan petri hingga memadat, lalu permukaannya diinokulasi dengan suspensi bakteri menggunakan *cotton swab* steril. Kertas cakram berdiameter 6 mm yang telah direndam dalam sampel minuman probiotik ditempatkan di atas permukaan agar. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, zona hambat diamati dan diukur sebagai area bening yang muncul di sekitar cakram (Harborne, 1987; CLSI, 2021).

Penetapan Konsentrasu Hambat Minimum (KHM)

Pengujian KHM dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode dilusi cair. Pengenceran dilakukan dengan mencampurkan minuman probiotik ke dalam akuades steril. Masing-masing tabung reaksi untuk variasi konsentrasi diisi dengan 1 mL akuades steril, kemudian ditambahkan 2 mL sampel probiotik untuk memperoleh konsentrasi bertingkat, yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, dan 50%. Setelah itu, 1 mL suspensi bakteri uji dimasukkan ke setiap tabung yang berisi larutan probiotik pada berbagai konsentrasi tersebut. Seluruh tabung kemudian diinkubasi selama 24 jam. Penentuan KHM dilakukan dengan mengamati tingkat kejernihan larutan, di mana konsentrasi terendah yang menghasilkan tampilan paling jernih dianggap sebagai konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Balouri *et al.*, 2016).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varians (ANOVA) adalah analisis yang digunakan pada riset ini. Analisis dilanjutkan dengan uji jarak berganda *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) apabila ditemukan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

HASIL

Skrining Fitokimia Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang

Tabel berikut menyajikan hasil skrining fitokimia pada kombucha daun sirsak dan kayu secang yang meliputi identifikasi golongan senyawa bioaktif utama yang terbentuk selama proses fermentasi terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang (*Identification of Secondary Metabolites Compounds in Soursop Leaves and Secang Wood Kombucha*).

Metabolit Sekunder (<i>Secondary Metabolites</i>)	HASIL (<i>Result</i>)
Alkaloid (<i>alkaloid</i>)	+
Flavonoid (<i>flavonoid</i>)	+
Tanin (<i>tannin</i>)	+
Fenol (<i>phenol</i>)	+
Steroid (<i>steroid</i>)	+
Saponin (<i>saponin</i>)	+

Keterangan: (+): Mengandung senyawa metabolit sekunder (-): Kombucha tidak mengandung senyawa metabolit sekunder (Note: (+): *Kombucha contains secondary metabolite compounds*, (-): *Kombucha does not contain secondary metabolite compounds*).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang ditunjukkan pada Tabel 1 diketahui bahwa minuman kombucha daun sirsak dan kayu secang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, steroid dan saponin.

Total Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Yeast Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang

Tabel 2 menunjukkan kandungan total Bakteri Asam Laktat (BAL) dan yeast pada kombucha daun sirsak dan kayu secang, yang menjadi indikator aktivitas fermentasi dan kualitas mikrobiologis kombucha.

Tabel 2. Total Bakteri Asam Laktat (BAL) dan Yeast pada Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang (*Total Lactic Acid Bacteria (LAB) and Yeast of Soursop Leaves and Secang Wood Kombucha*).

Perlakuan (<i>Treatment</i>)	Total Bakteri Asam Laktat (<i>Total Number of Lactic Acid Bacteria</i>) (CFU/ml)	Total Yeast (<i>Total Number of Yeast</i>) (CFU/ml)
P1D1	$1,6 \times 10^3 \pm 0,12$	$3,2 \times 10^3 \pm 0,05$
P1D2	$6,3 \times 10^4 \pm 0,18$	$1,6 \times 10^4 \pm 0,21$
P1D3	$1,3 \times 10^6 \pm 0,25$	$2,0 \times 10^6 \pm 0,28$
P1D4	$3,2 \times 10^2 \pm 0,20$	$1,0 \times 10^2 \pm 0,29$
P2D1	$2,0 \times 10^3 \pm 0,11$	$4,0 \times 10^3 \pm 0,19$
P2D2	$7,9 \times 10^4 \pm 0,20$	$2,0 \times 10^4 \pm 0,14$
P2D3	$1,6 \times 10^6 \pm 0,24$	$2,5 \times 10^6 \pm 0,22$
P2D4	$4,0 \times 10^2 \pm 0,18$	$1,3 \times 10^2 \pm 0,27$
P3D1	$2,5 \times 10^3 \pm 0,10$	$5,0 \times 10^3 \pm 0,20$
P3D2	$1,0 \times 10^4 \pm 0,19$	$3,2 \times 10^4 \pm 0,13$
P3D3	$2,0 \times 10^6 \pm 0,22$	$3,2 \times 10^6 \pm 0,23$
P3D4	$5,0 \times 10^4 \pm 0,21$	$1,6 \times 10^4 \pm 0,18$

Keterangan (*Description*): Data disajikan dalam bentuk *colony forming units* (CFU/mL) dan ditampilkan sebagai nilai rata-rata 3 ulangan \pm standar deviasi (*Data are presented in the unit of colony forming units (CFU/mL) and are displayed as the average value of 3 replicates \pm standard deviation*).

Populasi BAL dan yeast pada fermentasi 0 hari (D1) relatif rendah sekitar 10^3 CFU/mL. Populasi mikroba meningkat secara signifikan mencapai 10^4 CFU/mL pada hari ke 4 fermentasi (D2). Kedua jenis mikroba mencapai jumlah tertinggi dan paling optimal pada hari ke 8 fermentasi (D3), yaitu mencapai 10^6 CFU/mL yang mengindikasikan periode fermentasi optimal. Pada hari ke 12 fermentasi (D4), populasi BAL dan yeast menurun hingga mencapai 10^4 CFU/mL yang menunjukkan konsorsium ini menuju death phase. Secara konsisten, perlakuan P3 menunjukkan jumlah BAL dan yeast yang sedikit lebih tinggi dibandingkan P1 dan P2 pada hampir semua tahapan fermentasi, terutama pada puncak fermentasi hari ke delapan (D3). Pada perlakuan P3D3 populasi BAL optimal tercatat sebesar $2,0 \times 10^6$ CFU/mL dan populasi yeast sebesar $3,2 \times 10^6$ CFU/mL

Aktivitas Antimikroba Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang

Tabel 3 menunjukkan rerata daya hambat kombucha daun sirsak dan kayu secang terhadap pertumbuhan bakteri uji.

Tabel 3. Rerata Daya Hambat Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang Terhadap Pertumbuhan Bakteri *E. coli* dan *S. aureus* (Mean of Zone Inhibition of Kombucha from Soursop Leaves and Secang Wood against *E. coli* and *S. aureus*).

Peralakuan (Treatment)	Zona Hambat <i>E. coli</i> (Inhibition of <i>E. coli</i>) (mm)	Zona Hambat <i>S.aureus</i> (Inhibition of <i>S.aureus</i>) (mm)
P1D1	0,0 ± 0,000 ^a	0,0 ± 0,000 ^a
P1D2	3,0 ± 0,000 ^b	3,7 ± 0,577 ^b
P1D3	8,0 ± 0,000 ^c	10,0 ± 0,000 ^d
P1D4	7,7 ± 0,577 ^c	9,3 ± 0,577 ^d
P2D1	0,0 ± 0,000 ^a	0,0 ± 0,000 ^a
P2D2	3,3 ± 0,577 ^b	4,3 ± 0,577 ^{bc}
P2D3	10,3 ± 0,577 ^e	14,0 ± 0,000 ^f
P2D4	9,0 ± 0,000 ^d	12,3 ± 0,577 ^e
P3D1	0,0 ± 0,000 ^a	0,0 ± 0,000 ^a
P3D2	3,7 ± 0,577 ^b	4,7 ± 0,577 ^c
P3D3	12,7 ± 0,577 ^g	15,7 ± 0,577 ^g
P3D4	11,7 ± 0,577 ^f	14,3 ± 0,577 ^f

Keterangan (Note): Huruf yang berbeda pada notasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($P < 0,05$) berdasarkan uji lanjut Duncan (Different letters in the notation indicate significant differences between treatments ($P < 0,05$) based on Duncan's further test).

Hasil uji aktivitas antimikroba kombucha daun sirsak dan kayu secang pada *E.coli*, menunjukkan diameter zona hambat berkisar antara 0,0–12,7 mm. Diameter zona hambat terendah (0,0 mm) pada perlakuan P1D1, P2D1, dan P3D1, sedangkan diameter zona hambat tertinggi (12,7 mm) didapatkan pada perlakuan P3D3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dan waktu fermentasi, juga interaksi antara kedua faktor berpengaruh nyata ($p < 0,05$) pada aktivitas antibakteri terhadap *E.coli*.

Diameter daerah hambat kombucha daun sirsak dan kayu secang pada *S.aureus* berkisar antara 0,0–15,7 mm. Diameter zona hambat terendah (0,0 mm) didapatkan pada perlakuan P1D1, P2D1, dan P3D1, sedangkan diameter zona hambat terbesar didapatkan pada perlakuan P3D3 dengan nilai 15,7 mm. Hasil menunjukkan bahwa formulasi dan waktu fermentasi berpengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap diameter zona hambat terhadap *S.aureus*. Selain itu, interaksi antara kedua faktor tersebut juga menunjukkan pengaruh yang signifikan ($p < 0,05$) terhadap diameter zona hambat *S.aureus*.

Penentuan Konsentrasu Hambat Minimum (KHM)

Tabel 4 dan 5, menunjukkan nilai KHM kombucha terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Tabel 4. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang Terhadap *E. coli* (Minimum inhibitory concentration of Kombucha Soursop Leaves and Secang Wood Against *E. coli*).

Konsentrasi (Concentration)	Pertumbuhan Bakteri (Bacterial Growth)	
	P3D3	P3D4
Kontrol positif (Positive control)	-	-
50%	-	-
40%	-	+
30%	+	+
20%	+	+
10%	+	+
Kontrol negatif (Negative control)	+	+

Keterangan (Description): (+): Menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, (-): Tidak terdapat pertumbuhan bakteri. **P3D3:** 70% daun sirsak dan 30% kayu secang dengan waktu fermentasi 8 hari, **P3D4:** 70% daun sirsak dan 30% kayu secang dengan fermentasi 12 hari ((+): showed bacteria growth, (-): No bacterial growth, **P3D3:** 70% soursop leaves and 30% secang wood with a fermentation time of 8 days, **P3D4:** 70% soursop leaves and 30% secang wood with a fermentation time of 12 days).

Tabel 4 menunjukkan perlakuan P3D3 (70% daun sirsak: 30% kayu secang, fermentasi 8 hari) mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* pada konsentrasi 40%, dengan nilai KHM 40% terhadap *E. coli*. Perlakuan P3D4 (70% daun sirsak : 30% kayu secang, fermentasi 12 hari) pada konsentrasi 50% menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *E. coli*, sedangkan bakteri *E.coli* masih menunjukkan pertumbuhan pada konsentrasi $\leq 40\%$.

Tabel 5. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) Kombucha Daun Sirsak dan Kayu Secang Terhadap *S. aureus* (Minimum inhibitory Concentration (MIC) of Kombucha Soursop Leaves and Secang Wood Against *S. aureus*).

Konsentrasi (Concentration)	Pertumbuhan Bakteri (Bacterial Growth)	
	P3D3	P3D4
Kontrol positif (Positive control)	-	-
50%	-	-
40%	-	-
30%	-	-
20%	-	+
10%	+	+
Kontrol negatif (Negative control)	+	+

Keterangan (Description): (+): Menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, (-): Tidak terdapat pertumbuhan bakteri. **P3D3:** 70% daun sirsak dan 30% kayu secang dengan waktu fermentasi 8 hari, **P3D4:** 70% daun sirsak dan 30% kayu secang dengan fermentasi 12 hari ((+): showed bacteria growth, (-): No bacterial growth, **P3D3:** 70% soursop leaves and 30% secang wood with a fermentation time of 8 days, **P3D4:** 70% soursop leaves and 30% secang wood with a fermentation time of 12 days).

Tabel 5 menunjukkan bahwa perlakuan P3D3 (70% daun sirsak : 30% kayu secang dengan waktu fermentasi 8 hari) pada konsentrasi 20% mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*, sehingga nilai KHM kombucha P3D3 terhadap *S. aureus* adalah 20%. Perlakuan P3D4 (70% daun sirsak : 30% kayu secang dengan fermentasi 12 hari) pada konsentrasi 30% bakteri tidak tumbuh. Pada konsentrasi 20% dan 10%, media masih tampak keruh, menunjukkan bahwa *S. aureus* tetap dapat tumbuh pada kedua konsentrasi tersebut.

PEMBAHASAN

Hasil skrining fitokimia pada Tabel 1 menunjukkan bahwa kombucha daun sirsak dan kayu secang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, steroid dan saponin. Keenam golongan senyawa ini dikenal luas memiliki aktivitas antioksidan dan berbagai khasiat farmakologis lainnya (Vitas *et al.*, 2013). Deteksi keberadaan senyawa-senyawa fitokimia ini sangat krusial karena berhubungan langsung dengan potensi aktivitas biologis dan manfaat kesehatan suatu produk alami.

Alkaloid adalah senyawa organik yang umumnya mengandung atom nitrogen dalam struktur heterosiklik. Senyawa ini ditemukan pada tanaman sebagai metabolit sekunder dengan aktivitas analgesik, antiinflamasi, antikanker, antihipertensi dan antimikroba (Owolabi *et al.* 2013). Flavonoid adalah kelompok polifenol yang banyak ditemukan pada tumbuhan dan mempunyai aktivitas antioksidan kuat yang dapat menetralkan radikal bebas, mengurangi stres oksidatif, dan memiliki sifat anti-inflamasi serta antikanker (Panche *et al.*, 2016). Tanin juga merupakan senyawa polifenol yang memberikan rasa pahit atau sepat (*astringent*). Tanin dikenal memiliki aktivitas antioksidan dan antimikroba, serta kemampuan mengikat protein yang berkontribusi pada efek kesehatan, seperti pencegahan penyakit degeneratif melalui penangkalan radikal bebas (Jayabalan *et al.*, 2008). Senyawa fenol merupakan kelompok besar metabolit sekunder tumbuhan yang secara umum memiliki kapasitas antioksidan tinggi. Fermentasi kombucha dapat meningkatkan ketersediaan dan bioaktivitas senyawa fenol karena aktivitas enzimatis mikroorganisme dapat memecah glikosida fenolik dan melepaskan senyawa fenol bebas (Pham *et al.*, 2014). Saponin adalah glikosida triterpenoid atau steroid yang dilaporkan memiliki aktivitas antiinflamasi, imunomodulator, antikanker, antikolesterol dan antimikroba dengan mengikat sterol pada membran, sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel mikroba bakteri. Proses fermentasi kombucha oleh kultur simbiosis bakteri dan yeast (SCOBY) mampu memodifikasi serta meningkatkan kandungan serta bioavailabilitas senyawa fenolik dan flavonoid dari bahan baku yang digunakan. Perubahan biokimia selama fermentasi ini juga dapat menghasilkan senyawa turunan baru yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan bahan asalnya (Wang *et al.*, 2024).

Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa, jumlah BAL dan yeast pada kombucha daun sirsak dan kayu secang memperlihatkan dinamika yang khas selama proses fermentasi. Pada fermentasi hari ke-0 (D1), populasi BAL dan yeast masih rendah, berkisar antara 10^3 – 10^4 CFU/mL. Nilai ini menunjukkan fase adaptasi mikroba (*lag phase*), di mana BAL maupun yeast mulai menyesuaikan diri dengan lingkungan fermentasi yang mengandung nutrisi dari substrat daun sirsak dan kayu secang (Marsh *et al.*, 2014). Memasuki hari ke-4 (D2), jumlah BAL meningkat hingga kisaran 10^4 – 10^5 CFU/mL, sementara yeast juga meningkat menjadi 10^4 CFU/mL. Peningkatan ini disebabkan oleh aktivitas yeast dalam menguraikan sukrosa menjadi etanol dan CO_2 , yang selanjutnya dimanfaatkan oleh BAL dan bakteri asam asetat untuk menghasilkan berbagai asam organik (Jayabalan *et al.*, 2014). Pada hari ke-8 (D3), populasi BAL dan yeast mencapai puncaknya dengan jumlah populasi 10^6 CFU/mL. Kondisi ini menunjukkan bahwa mikroba berada pada fase eksponensial. Namun, pada hari ke-12 (D4), terjadi penurunan jumlah BAL maupun yeast secara drastis mencapai 10^4 CFU/mL. Hal ini berkaitan erat dengan kondisi fermentasi yang semakin asam (pH 2,7–2,9), sehingga hanya mikroba asidofilik yang mampu bertahan. Lingkungan asam ekstrem menghambat pertumbuhan sebagian besar mikroorganisme dan menyebabkan populasi mikroba patogen menurun (Villarreal *et al.*, 2018). Wistiana & Zubaidah (2015), melaporkan hasil serupa, dimana total BAL pada berbagai jenis daun teh kaya fenol mencapai puncak pada hari ke-8 fermentasi, dengan nilai mencapai $9,90 \times 10^5$ CFU/mL dan menurun pada hari ke-14. Villarreal *et al.* (2018), menambahkan bahwa dinamika komunitas mikroba dan perilaku metabolit selama fermentasi menunjukkan puncaknya pada pertengahan siklus fermentasi dengan rentang waktu 7 sampai 10 hari.

FAO/WHO menyebutkan bahwa produk makanan/minuman yang mengandung probiotik sebaiknya memiliki $\geq 10^6$ CFU/mL untuk mendapatkan efek kesehatan yang optimal. Berdasarkan hal tersebut, maka produk ini telah memenuhi standar sebagai minuman probiotik yang diharapkan dapat memberikan efek menyehatkan pada saluran cerna. BAL dalam saluran pencernaan dapat menghambat patogen, memproduksi metabolit bioaktif dan modulasi metabolik, memperbaiki integritas barrier mukosa serta menstimulasi produksi imun lokal seperti IgA, dan sitokin (Ren *et al.*,

2018). Perlakuan P1 (90% daun sirsak : 10% kayu secang), P2 (80% daun sirsak : 20% kayu secang), dan P3 (70% daun sirsak : 30% kayu secang) menunjukkan pola pertumbuhan yang relatif sama. Meskipun demikian, P3 yang mengandung kayu secang lebih tinggi cenderung mendukung pertumbuhan BAL dan yeast sedikit lebih besar pada puncak fermentasi hari ke 8. Hal ini dapat dikaitkan dengan keberadaan senyawa polifenol dan brazilin dalam kayu secang yang berperan sebagai sumber nutrisi tambahan bagi mikroba, selain berfungsi sebagai antioksidan (Ekawati *et al.*, 2024). Berdasarkan hasil ini dapat ditunjukkan bahwa proses fermentasi kombucha daun sirsak dan kayu secang mengikuti pola umum fermentasi kombucha, yaitu populasi mikroba meningkat pada awal hingga pertengahan fermentasi, mencapai puncak pada hari ke-8, dan menurun kembali pada akhir fermentasi akibat kondisi lingkungan yang terlalu asam. Dinamika ini sangat penting karena memengaruhi pembentukan karakteristik sensoris, keamanan, dan potensi fungsional kombucha termasuk aktivitas antibakterinya.

Aktivitas antibakteri kombucha daun sirsak dan kayu secang menunjukkan perbedaan yang nyata pada setiap formulasi serta lama fermentasi. Pada fermentasi 0 hari (D1), semua perlakuan (P1D1, P2D1, P3D1) tidak menunjukkan adanya zona hambat baik terhadap *E. coli* (Tabel 3) maupun *S. aureus* (Tabel 4). Hal ini disebabkan karena pada awal fermentasi pertumbuhan konsorsium mikroba dalam kombucha yang berperan dalam pembentukan senyawa antibakteri belum tumbuh optimal, sehingga senyawa metabolit sekunder (asam organik, polifenol, flavonoid, dan senyawa fenolik) belum terbentuk dalam jumlah yang signifikan (Sintyadewi *et al.*, 2023).

Aktivitas antibakteri mulai muncul pada fermentasi 4 hari (D2) dengan zona hambat berkisar antara 3,1–4,8 mm. Hal ini mengindikasikan bahwa proses fermentasi mulai menghasilkan metabolit yang bersifat sebagai antimikroba seperti asam asetat, asam glukonat, serta senyawa polifenol terdegradasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Kadyan *et al.*, 2021). Peningkatan aktivitas antibakteri yang lebih nyata terlihat pada fermentasi 8 hari (D3), yaitu pada perlakuan P3D3 (70% daun sirsak : 30% kayu secang). Zona hambat yang ditunjukkan pada perlakuan P3D3 terhadap *E. coli* mencapai 12,7 mm dan terhadap *S. aureus* sebesar 15,7 mm yang menunjukkan bahwa proporsi kayu secang dan lama waktu fermentasi mempengaruhi aktivitas antibakteri dari minuman probiotik ini. Sintyadewi *et al.* (2023), melaporkan hal serupa dimana aktivitas antibakteri kombucha bunga kecombrang terhadap patogen saluran pencernaan paling optimal terjadi pada fermentasi 9 hari dengan daya hambat sebesar 12,0 mm terhadap *Escherichia coli*, 11,5 mm terhadap *Salmonella thypimurium* dan 14,5 mm terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada fermentasi 9 hari, konsorsium mikroba dalam kombucha berada pada fase eksponensial menuju fase stationer. Menurut Ruiz *et al.* (2010), bakteri umumnya menghasilkan senyawa metabolit sekunder (asam asetat, asam laktat, etanol, diasetil, dan karbondioksida) yang bersifat antibakteri pada fase eksponensial sampai menuju fase stationer.

Kayu secang diketahui mengandung senyawa aktif seperti brazilin yang memiliki sifat antibakteri melalui mekanisme penghambatan sintesis dinding sel dan kerusakan membran bakteri (Kusmita *et al.*, 2020). Mekanisme penghambatan lain diduga juga disebabkan oleh kandungan metabolit sekunder (alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, dan terpenoid) yang terkandung dalam minuman probiotik ini seperti yang ditunjukkan pada hasil skrining fitokimia (Tabel 1). Menurut Arifin & Ibrahim (2019), tanin dan fenol menunjukkan aktivitas antibakteri yang cukup kuat melalui mekanisme denaturasi protein dan gangguan permeabilitas serta inhibisi enzim pencernaan. Mamta *et al.*, (2013), melaporkan bahwa senyawa terpenoid termasuk monoterpen dan seskuiterpen merupakan antibakteri alami yang bekerja melalui dirupsi dinding sel, inhibisi proses respirasi bakteri serta mengganggu komponen hidrofobik membran sel bakteri. Arifin & Ibrahim (2019), menambahkan bahwa senyawa flavonoid yang terkandung dalam sampel dapat berinteraksi dengan lipid membran sehingga meningkatkan permeabilitas dan menyebabkan kebocoran isi sel bakteri. Senyawa ini lebih efektif terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) yang memiliki struktur membran yang lebih sederhana dibandingkan dengan *E. coli*. Hal ini selaras dengan hasil penelitian yang telah dilakukan, di mana rerata diameter zona hambat pada *S. aureus* cenderung lebih besar dibandingkan *E. coli* pada semua perlakuan, meskipun secara statistik perbedaan tersebut tidak menunjukkan hasil yang signifikan ($p > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa aktif dalam minuman probiotik

kayu secang memiliki potensi antibakteri yang relatif setara dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun Gram negatif pada konsentrasi yang diuji.

Tabel 2 menunjukkan bahwa meningkatnya populasi BAL dan yeast selama fermentasi kombucha berkorelasi positif dengan meningkatnya aktivitas antibakteri terhadap patogen saluran cerna *E. coli* dan *S. aureus*. Pada perlakuan P3D3 korelasi ini ditunjukkan dengan pertumbuhan populasi BAL dan yeast yang optimal seiring dengan rerata zona hambat yang tinggi pada kedua bakteri uji. Bakteri asam laktat mendominasi fase fermentasi kombucha setelah koloni SCOBY, menghasilkan asam organik yang menekan pH hingga <4, menciptakan lingkungan asam yang toksik bagi *E. coli* (Gram-negatif) dan *S. aureus* (Gram-positif) (Sanwal *et al.*, 2023). Populasi BAL meningkat signifikan pada fermentasi hari ke-7 hingga 14, berkontribusi pada kompetisi nutrisi dan produksi bakteriosin yang merusak dinding sel bakteri patogen. Beberapa strain BAL (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus spp.*) menghasilkan bakteriosin yang mampu menghambat bakteri Gram-positif (*S. aureus*) dan Gram-negatif baik secara langsung maupun dengan meningkatkan kerentanan permeabilisasi membran terhadap asam. Produksi bakteriosin ini berkorelasi dengan jumlah atau aktivitas BAL (Zhu & Zhang., 2020). Menurut Al-Mohammadi *et al.* (2021), beberapa BAL menghasilkan H₂O₂ sebagai produk samping metabolisme, yang bersifat toksik bagi bakteri patogen dan memperkuat efek asam. Mikrobiota kombucha dapat memodifikasi polifenol yang terkandung dalam bahan baku menjadi metabolit yang memiliki aktivitas antimikroba lebih tinggi, sehingga seiring fermentasi dan dengan meningkatnya populasi BAL maka komponen fenolik aktif dapat bertambah. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Sintyadewi *et al.* (2023), yang melaporkan bahwa aktivitas antibakteri kombucha bunga kecombrang sejalan dengan peningkatan populasi BAL serta dipengaruhi oleh lama waktu fermentasi.

Formulasi P3D3 dan P3D4 dari penelitian ini menunjukkan hasil rerata zona hambat terbesar, sehingga kedua formulasi ini diuji lanjut untuk menentukan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) untuk mengetahui potensi antibakterinya. Tabel 5 menunjukkan perbedaan nilai KHM pada kedua formulasi tersebut, yang mengindikasikan bahwa kedua formulasi memiliki tingkat efektivitas yang berbeda dalam menghambat bakteri uji *E. coli* dan *S. aureus*. Formulasi dengan nilai KHM lebih rendah menunjukkan efektivitas antibakteri yang lebih kuat secara nyata. Perbedaan KHM antara P3D3 (8 hari fermentasi) dan P3D4 (12 hari fermentasi) dapat disebabkan oleh dinamika metabolit bioaktif selama proses fermentasi. Pada fermentasi 8 hari, akumulasi senyawa antibakteri seperti asam organik (asam asetat, asam glukonat), polifenol, flavonoid, dan senyawa fenolik terdegradasi berada pada konsentrasi optimal sehingga efektivitas antibakterinya lebih tinggi (Villarreal *et al.*, 2018). Namun, setelah fermentasi diperpanjang hingga hari ke-12, kondisi medium menjadi lebih asam dengan penurunan kadar nutrisi. Hal ini dapat memicu degradasi sebagian senyawa antibakteri atau terbentuknya metabolit sekunder yang justru menurunkan efektivitas penghambatan (Greewalt, 2020). Hasil uji penetapan nilai KHM menunjukkan kombucha daun sirsak dan kayu secang lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dibandingkan *E. coli* (Tabel 5). Hal ini disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel bakteri Gram positif (*S. aureus*) yang lebih sederhana sehingga lebih rentan terhadap serangan senyawa fenolik, flavonoid, asam organik, dan metabolit sekunder dari kombucha. Sebaliknya, *E. coli* sebagai Gram negatif memiliki lapisan lipopolisakarida (LPS) yang lebih kompleks dan mampu menjadi penghalang masuknya senyawa antibakteri (Cushnie & Lamb, 2011).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fermentasi kombucha daun sirsak dan kayu secang mampu meningkatkan populasi BAL hingga menjapai kisaran 10⁶ CFU/ml, yang memenuhi standar minimal untuk dikategorikan sebagai minuman probiotik. Kenaikan populasi BAL ini berkontribusi signifikan terhadap peningkatan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* melalui produksi asam organik, hidrogen peroksida, transformasi senyawa fenolik, serta kemungkinan pembentukan bakteriosin. Hasil penelitian ini menegaskan bahwa kombucha daun sirsak dan kayu secang memiliki potensi besar sebagai minuman probiotik yang tidak hanya memenuhi kriteria jumlah mikroba hidup, tetapi juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang relevan untuk mendukung kesehatan saluran cerna. Dengan demikian, formulasi kombucha ini berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai minuman fungsional dengan manfaat biologis yang terverifikasi secara ilmiah.

KESIMPULAN

Formulasi P3D3 dengan komposisi 70% daun sirsak dan 30% kayu secang yang difermentasi selama 8 hari dapat disimpulkan sebagai formulasi terbaik. Formulasi ini memiliki potensi sebagai minuman probiotik dengan total bakteri asam laktat (BAL) dan yeast masing-masing sebesar $2,0 \times 10^6$ CFU/mL dan $3,2 \times 10^6$ CFU/mL. Formulasi P3D3 juga menunjukkan aktivitas antibakteri tertinggi yang ditunjukkan oleh zona hambat 12,7 mm terhadap *E. coli* dan 15,7 mm terhadap *S. aureus*. Nilai KHM pada perlakuan P3D3 mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* berturut-turut sebesar 40% dan 20%. Skrining fitokimia mengonfirmasi adanya senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, fenol, steroid dan saponin pada kombucha daun sirsak dan kayu secang yang diduga kuat berkontribusi terhadap bioaktivitasnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung penelitian dan terbitnya artikel ini

KONTRIBUSI PENULIS

ABP: mengumpulkan data penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir; WM: Membuat konsep penelitian, merevisi naskah akhir; IMS: Membuat kosep penelitian, membuat draf artikel, merevisi naskah akhir.

REFERENSI

- Al-Mohammadi, A.-R., Ismaiel, A. A., Ibrahim, R. A., Moustafa, A. H., Abou Zeid, A., & Enan, G. 2021. Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. *Molecules*, 26(16), p.5026.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. 2019. *Phytochemical compounds as antibacterial agents: Mechanisms and potentials*. *Journal of Herbal Medicine*, 12(3), pp.145–154.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp.71-79.
- Bhattacharya, D., Bhattacharya, S., Patra, M. M., Chakravorty, S., Sarkar, S., *et al.* 2016. Antibacterial activity of polyphenolic fraction of kombucha against enteric bacterial pathogens. *Current microbiology*, 73(6), pp.885-896.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2021. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (31st ed.). CLSI supplement M100. CLSI.
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 38(2), pp.99-107.
- Ekawati, N., Sasikirana, W., Annisaa' E, Dini, I.R.E. 2024. Uji aktivitas antioksidan serta formulasi tablet hisap ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). *Majalah Farmasi dan Farmakologi, special issue*, pp.32-36.
- Ferris, M. M., Subitoni Antonio, L., & Al-Sadi, R. 2025. *Probiotics and the intestinal tight junction barrier function*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 13, p.1671152
- Greenwalt, C. J., Steinkraus, K. H., & Ledford, R. A. 2000. Kombucha, the fermented tea: microbiology, composition, and claimed health effects. *Journal of Food Protection*, 63(7), pp.976–981.
- Harborne, J. B. 1987. Chemical signals in the ecosystem. *Annals of Botany*, 60, pp.39-57.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2007. *Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for microbiological examinations*.
- Jayabalan, R., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., Vitas, J. S., & Sathishkumar, M. 2014. A review on kombucha tea-microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), pp.538-550.

- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M., & Swaminathan, K. 2008. Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. *Food Chemistry*, 109(1), pp.227-234.
- Kadyan, S., Rashmi, H.M., Pradhan, D., Kumari, A., Chaudhari, A & Deshwal, G.K. 2021. Effect of lactic acid bacteria and yeast fermentation on antimicrobial, antioxidative and metabolomic profile of naturally carbonated probiotic whey drink. *LWT Food Science and Technology*, 142. p.111059.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P., & Ajandouz, E. H. 2012. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International*, 49(1), pp.226-232.
- Kandhasamy, M., & Arunachalam, K. D. 2020. Phytochemical screening and quantification of total phenolic and flavonoid contents in medicinal plant extracts. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 8(5), pp.70–78.
- Kusmita, L., Nurjanah, N., & Putri, R. 2020. Aktivitas antibakteri ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) terhadap bakteri patogen. *Jurnal Kimia Riset*, 5(2), pp.123–130.
- Mamta, S., Jyoti, S., Rajeev, N., Dharmendra, S., & Amit, S. 2013. Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(6), pp.168–182.
- Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. 2014. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. *Food Microbiology*, 38, pp.171-178.
- Moghadamtousi, S. Z., Fadaeinasab, M., Nikzad, S., Mohan, G., Ali, H. M., & Kadir, H. A. 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), pp.15625-15658.
- Owolabi, M. S., Lawal, O. A., & Oloyede, G. K. 2013. Alkaloid, saponin, and phenolic contents of Nigerian medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(2), pp.85–90.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, p.e47
- Pham, T. H., Shah, N. P., & Britz, M. L. 2014. Bioactive compounds and antioxidant properties of fermented tea kombucha. *International Food Research Journal*, 21(2), pp.491–498.
- Ruiz, B., A. Chavez, A. Forero, Y. GarcíaHuante, A. Romero, & M. Sánchez. 2010. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crit. Rev. Microbiol*, 36, pp.146–167.
- Ren, C., Dokter-Fokkens, J., Figueroa Lozano, S., Zhang, Q., de Haan, et al. 2018. Lactic acid bacteria may impact intestinal barrier function by modulating goblet cells. *Molecular nutrition & food research*, 62(6), p.1700572.
- Sanwal, N., Gupta, A., Bareen, M. A., Sharma, N., & Sahu, J. K. 2023. Kombucha fermentation: Recent trends in process dynamics, functional bioactivities, toxicity management, and potential applications. *Food chemistry advances*, 3, p.100421.
- Sintyadewi, P. R., & Fitriani, P. P. E. 2024. Determination of Antioxidant Activity in Kombucha of Kecombrang Flower (*Etlintera elatior*) for the Development of Functional Beverages. *Jurnal Pijar Mipa*, 19(2), pp.343-347.
- Sintyadewi, P. R., Fitriani, P. P. E., Widnyani, I. A. P. A., & Indrayoni, P. 2023. Potensi Aktivitas Antibakteri Minuman Fungsional Kombucha Berbahan Dasar Bunga Kecombrang (*Etlintera elatior*) Berdasarkan Lamanya Waktu Fermentasi. *Jurnal Biologi Tropis*, 23(1), pp.403-410.
- Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. 2018. Understanding kombucha tea fermentation: A review. *Journal of Food Science*, 83(3), pp.580–588.
- Vitas, J. S., Malbaša, R. V., Lončar, E. S., & Grahovac, J. A. 2013. Influence of fermentation temperature on the antioxidant activity of kombucha. *Food Chemistry*, 138(1), pp.171–176.

- Vorha, B.M., Shazrul, F., Fareed S., Othman, B.A. 2019. Effects of Medium Variation and Fermentation Time on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Kombucha. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, pp.298-302
- Wang, L., Zhou, R., Zhang, X., & Song, D. 2024. Changes and biotransformation mechanism of main functional compounds during kombucha fermentation by the pure cultured tea fungus. *Food Chemistry*, 458, p.140242.
- Wistiana, D., & Zubaidah, E. 2015. Karakteristik Kimiawi Dan Mikrobiologis Kombucha Dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3(4), pp.1446-1457.
- Zheng, Y., Zhang, Z., Tang, P., Wu, Y., Zhang, A., *et al.* 2023. Probiotics fortify intestinal barrier function: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Frontiers in Immunology*, 14, p.1143548.
- Zhu, Y., & Zhang, S. 2020. Antibacterial activity and mechanism of lacidophilin from *Lactobacillus pentosus* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 11, p.582349.