

VOLUME 15, NOMOR 1 MARET 2021

**ISSN: 1907-8056
e-ISSN: 2527-5410**

AGROINTEK

JURNAL TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

**JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN
UNIVERSITAS TRUNOJOYO MADURA**

AGROINTEK: Jurnal Teknologi Industri Pertanian

Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian is an open access journal published by Department of Agroindustrial Technology, Faculty of Agriculture, University of Trunojoyo Madura. Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian publishes original research or review papers on agroindustry subjects including Food Engineering, Management System, Supply Chain, Processing Technology, Quality Control and Assurance, Waste Management, Food and Nutrition Sciences from researchers, lecturers and practitioners. Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian is published four times a year in March, June, September and December.

Agrointek does not charge any publication fee.

Agrointek: Jurnal Teknologi Industri Pertanian has been accredited by ministry of research, technology and higher education Republic of Indonesia: 30/E/KPT/2019. Accreditation is valid for five years. start from Volume 13 No 2 2019.

Editor In Chief

Umi Purwandari, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Editorial Board

Wahyu Supartono, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Michael Murkovic, Graz University of Technology, Institute of Biochemistry, Austria

Chananpat Rardniyom, Maejo University, Thailand

Mohammad Fuad Fauzul Mu'tamar, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Khoirul Hidayat, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Cahyo Indarto, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Managing Editor

Raden Arief Firmansyah, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Assistant Editor

Miftakhul Efendi, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Heri Iswanto, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Safina Istighfarin, University of Trunojoyo Madura, Indonesia

Alamat Redaksi

DEWAN REDAKSI JURNAL AGROINTEK

JURUSAN TEKNOLOGI INDUSTRI PERTANIAN

FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS TRUNOJOYO MADURA

Jl. Raya Telang PO BOX 2 Kamal Bangkalan, Madura-Jawa Timur

E-mail: Agrointek@trunojoyo.ac.id

IDENTIFIKASI BAKTERI ASAM LAKTAT DARI KOMBUCHA ROSELLA

Merkuria Karyantina^{1*}, Sumarmi²

¹Fakultas Teknologi dan Industri Pangan Universitas Slamet Riyadi Surakarta, Indonesia

²Fakultas Pertanian Universitas Slamet Riyadi Surakarta, Indonesia

Article history

Diterima:
27 Mei 2020
Diperbaiki:
31 Oktober 2020
Disetujui:
10 November 2020

Keyword

*Terdiri dari istilah-
kombucha roselle;
probiotic; isolate;
Lactobacillus;
Lactococcus*

ABSTRACT

Kombucha is one type of traditional fresh drink derived from fermented sweet tea water for 7-10 days. Bacteria play a role in the kombucha fermentation process are acetic acid acid bacteria and lactic acid bacteria. This study aims to isolation and identification lactic acid bacteria that play a role in the kombucha rosella fermentation. The study was conducted using De Man, Rogosa and Sharpe media to add CaCO₃ 1 %. Colonies that grow and provide clear zones are purified several times to obtain uniform colonies morphologically and biochemically. The 18 isolates identified 8 isolates that have the characteristics of lactic acid bacteria. Analysis with API 50CH KIT identified 4 isolates from the genera Lactobacillus and 4 isolates from the genus Lactococcus.

© hak cipta dilindungi undang-undang

* Penulis korespondensi

Email : kar_yantina@yahoo.com

DOI 10.21107/agrointek.v15i1.7340

PENDAHULUAN

Kombucha merupakan salah satu jenis minuman segar tradisional yang dihasilkan dari proses fermentasi air teh manis selama 7–10 hari dengan bantuan pertumbuhan simbiosis antara *yeast* dan bakteri, mengandung alkohol $\pm 0,5$ –1 % dan pH ± 3 –5,5 (Naland, 2004).

Kombucha merupakan fermentasi teh manis dengan bantuan simbiosis bakteri dan *yeast*. Interaksi mikroorganisme ini menghasilkan selapis selulosa pada permukaan teh fermentasi. Semakin lama, lapisan semakin tebal. Komponen kultur bakteri dipelajari lebih jauh untuk membandingkan spesies yang berperan, diantaranya Bakteri asam asetat. Pada masa sekarang, bakteri asam laktat dilaporkan meningkat sampai 30 % dari populasi kultur kombucha (Marsh *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2010).

Teh kombucha dipercaya oleh penyuka kombucha dunia, memiliki manfaat bagi kesehatan. Sebagian penelitian, hanya mempelajari dengan menggunakan model percobaan dan belum banyak bukti ilmiah pendukung yang menggunakan manusia sebagai model. Penelitian yang berkembang tentang efek antimikrobia, antioksidan, hepatoprotektif dan antikanker. Efek kombucha dilaporkan berdasarkan kesaksian dari penyuka kombucha.

Jamur teh atau kombucha merupakan simbiosis antara bakteri asam asetat dan spesies *yeast* osmofilik di lapisan yang ditemukan pada fermentasi teh manis. Komposisi mikrobial yang tepat pada kombucha tidak bisa spesifik ditentukan, karena bervariasi tergantung sumber karbon dan inokulum dalam fermentasi teh.

Lapisan selulosa yang terbentuk selama fermentasi oleh *Acetobacter xylinum* tampak sebagai lembaran tipis

pada permukaan teh, dimana massa sel bakteri dan *yeast* terbentuk. Kultur campuran mikroorganisme dan selulosa dimungkinkan disebut dengan jamur teh. Lapisan biofilm mikroorganisme kombucha mengambang di permukaan teh dan mirip dengan lapisan atas jamur (Watawana *et al.*, 2015). Membran selulosa mempertahankan mikroorganisme di permukaan, sehingga memungkinkan ketersediaan oksigen yang cukup untuk pengembangan dan melindungi mikroorganisme dalam kombucha dari sinar UV yang berasal dari matahari (Leal *et al.*, 2018).

Vina *et al.* (2013), menyatakan bahwa variabel fermentasi proses, seperti waktu, suhu dan konsentrasi sukrosa, akan mempengaruhi konsentrasi produk akhir zat organik seperti asam dan pH. Asam organik diproduksi selama proses, yang menyebabkan kurangnya oksigen menginduksi keasaman. Turunnya pH akan menekan jumlah sel patogen, sehingga menghasilkan minuman yang aman dikonsumsi.

Beberapa faktor berperan penting dalam konsentrasi kandungan kombucha, salah satunya adalah suhu. Penelitian Fu *et al.* (2014) menyatakan bahwa menyimpan kombucha pada suhu 4 °C akan menurunkan kandungan asam asetat dari $9,3 \times 10^6$ CFU/ml menjadi $3,4 \times 10^6$ CFU/ml selama 14 hari, sedangkan asam laktat menurun secara signifikan sebesar 0,98 % setelah 8 hari penyimpanan. Penelitian Suharja dan Henriksson (2012) melaporkan bahwa *yeast* mempunyai pengaruh positif pada kelangsungan hidup bakteri asam laktat pada suhu 30 °C tetapi tidak pada suhu 12 °C. Fu *et al.* (2014), menyatakan bahwa pada suhu rendah (4 °C) dimungkinkan akan mempengaruhi efek positif *yeast* terhadap bakteri asam laktat dan menurunkan tingkat kelangsungan hidupnya.

Bakteri dan *yeast* osmofil yang diinokulasi pada kombucha, memainkan peran dalam pertumbuhan jamur teh pada kombucha. Mikroorganisme menggunakan sukrosa sebagai sumber karbon, bakteri asam asetat (*Acetobacter xylinum*) membentuk jaringan selulosa sebagai senyawa metabolit. Simbiotik bakteri dan *yeast* akan menempel pada lapisan selulosa (biofilm) membentuk *membrane gel* yang semakin tebal (Leal *et al.*, 2018).

Marsh *et al.* (2014) melaporkan bahwa terdapat 5 bakteri dominan dalam 5 sampel kombucha (2 dari Kanada dan 1 masing-masing dari Irlandia, Amerika Serikat dan Inggris). Bakteri dominan tersebut adalah genera *Gluconacetibacter* (lebih dari 85 % sampel), dan *Lactobacillus* (sampai 30 % sampel). *Acetobacter* ditemukan dalam jumlah yang sangat sedikit (kurang dari 2 %). *Gluconacetobacter* sp A4 memiliki kemampuan kuat dalam menghasilkan *D-sacharic acid -1,4 lactone* (DSL) dan merupakan spesies bakteri fungsional utama yang terisolasi dari Kombucha (Yang *et al.*, 2010).

Yeast dan bakteri terlibat dalam aktivitas metabolisme dalam penggunaan substrat yang berbeda-beda. Ragi menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa oleh invertase dan menghasilkan etanol melalui jalur glikolisis, dengan fruktosa sebagai substrat. Bakteri asam asetat memanfaatkan glukosa untuk menghasilkan asam glukonat dan etanol untuk menghasilkan asam asetat. Nilai pH kombucha akan menurun karena produksi asam organik selama fermentasi (Jayabalan *et al.*, 2014).

Selama fermentasi, terjadi degradasi komponen dalam teh sebagai substrat. Wang *et al.* (2010) meneliti tentang kandungan DSL (*D-sacharic acid -1,4 lactone*) dari kombucha, yang berkisar 57,99 (sampel dari rumah tangga) sampai

132,72 µg/ml (sampel dari laboratorium). Yang *et al.* (2010), menyatakan bahwa terjadi peningkatan kandungan DSL selama 8 hari fermentasi, setelah tercapai maksimal akan diikuti penurunan kandungan DSL sampai akhir fermentasi. Peneliti menyimpulkan bahwa bakteri asam laktat memiliki efek positif pada produksi DSL, dalam simbiosisnya dengan *Gluconacetobacter* sp A4.

Komposisi dalam kombucha menunjukkan adanya banyak senyawa di dalamnya, dan tergantung pada substrat kombucha, waktu dan suhu proses, serta mikroorganisme yang ada pada starter. Beberapa penelitian telah dilakukan dengan pembuatan kombucha dengan berbagai substrat, seperti anggur merah, ekstrak *Yerusalem artichoke*, susu, *whey*, daun *pepermint* dan lain sebagainya. Varietas daun teh yang berbeda, jenis bahan baku, jumlah gula, waktu fermentasi dan komposisi jamur teh, akan memberikan perbedaan komposisi kombucha dan aktivitas biologis kombucha (Jayabalan *et al.*, 2014).

Hasil penelitian Nguyen *et al.* (2015), tentang suplementasi bakteri asam laktat dari kefir selama fermentasi kombucha menunjukkan bahwa terjadi peningkatan fungsi biologi selama fermentasi, antara lain meningkatkan produksi asam glukoronat, meningkatkan aktivitas antibakteri dan antioksidan dari kombucha. Puspawati (2016), telah mengisolasi bakteri yang terindikasi sebagai bakteri asam laktat dari kombucha teh. 20 isolat yang diperoleh 15 isolat resisten terhadap pH rendah dan 13 isolat resisten terhadap *bile salt*. Isolat tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat probiotik yang memberikan kontribusi untuk kesehatan saluran pencernaan.

Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, bahwa perlu digali lagi tentang mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi kombucha, terutama

kombucha dengan bahan baku rosella. Perbedaan substrat akan menghasilkan komposisi kimia dan mikroorganisme yang berbeda dari kombucha. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengidentifikasi bakteri asam laktat yang berperan selama fermentasi kombucha rosella.

METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelopak bunga rosella (diperoleh dari pasar tradisional di Solo), starter kombucha (diperoleh dari perusahaan Indokombu, Bandung), *DeMan, Rogosa and Sharpe* (MRS) merck, agar, CaCO₃ (merck), API 50CH Kit (Biomeriux, France), bahan untuk pengecatan gram bakteri, dan bahan penunjang analisis lainnya.

Preparasi sampel

Preparasi sampel (gambar 2) sebagai berikut kombucha rosella dibuat dari fermentasi teh dari kelopak bunga rosella (8 g/l) yang diseduh dengan air panas serta ditambahkan gula 10 % (dari total cairan), dan diaduk sampai homogeny serta disaring. Seduahn rosella kemudian disterilisasi (121 °C selama 15 menit). Cairan kelopak rosella kemudian didinginkan dan setelah dingin (45 °C), ditambahkan jamur kombu 10 % dan difermentasi selama 14 hari. Wadah fermentasi menggunakan botol selai dan ditutup dengan kain steril. Kondisi fermentasi adalah pada suhu ruang serta semi aerobic.

Isolasi dan pemurnian

Isolasi bakteri asam laktat dari kombucha rosella dilakukan dengan menggoreskan (*streak plate*) pada media MRS agar ditambah dengan CaCO₃ 1 % dan diinkubasi selama 2 hari. Koloni yang menunjukkan zona jernih (*clear zone*) dimurnikan lagi dengan media yang sama. Pemurnian (*streak plate*) dilakukan

berulang sampai diperoleh koloni yang seragam, kurang lebih 3 kali pemurnian.

Uji morfologi

Setelah koloni seragam, dilakukan uji morfologi bentuk sel dan pengecatan gram bakteri dengan cara sederhana. Bakteri umur 18-24 jam diambil dan diletakkan pada *deckglass* kemudian ditetesi *methylen blue*, selanjutnya diamati di mikroskop. Bentuk bakteri asam laktat adalah batang atau bulat. Hal tersebut juga dilakukan untuk uji pengecatan gram, menggunakan cairan gram A, gram B, gram C dan gram D, selanjutnya diamati di mikroskop. Koloni bakteri asam laktat berwarna ungu saat dilakukan pewarnaan (Rahayu dan Margino, 1997)

Uji biokimia

Uji biokimia terhadap isolat terduga dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada beberapa kondisi suhu, pH dan kadar garam (Rahayu dan Margino, 1997). Selanjutnya isolat diuji secara fenotip menggunakan kit yaitu API 50CHL kit (Biomeriux, France). Prinsip API 50CHL kit adalah asimilasi karbohidrat dan fermentasi dengan 49 sumber karbon dan 1 lubang sebagai kontrol. Hasil dari reaksi, akan dibandingkan dengan database

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kombucha dapat dibuat dari teh hijau, teh oolong dan teh hitam. Tetapi untuk tujuan pengobatan, paling baik menggunakan teh hijau karena mengandung lebih dari 36 % polifenol sebagai komponen bioaktifnya dibandingkan teh hitam. Senyawa polifenol tersebut berperan sebagai penangkap radikal bebas hidroksil sehingga tidak mengoksidasi lemak, protein dan DNA dalam sel. Kandungan polifenol sebagai senyawa antioksidan inilah yang berkhasiat bagi kesehatan.

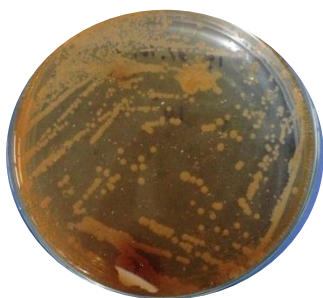
Selama proses fermentasi larutan teh manis akan terjadi perubahan gula di dalam

larutan teh tersebut menjadi berbagai jenis asam, vitamin, dan alkohol. Potensi antioksidan kombucha juga tidak lepas dari peranan media air teh yang mengandung senyawa-senyawa bermanfaat seperti polifenol, theofilin, flavonoid/metixantin, tanin, vitamin C dan E, catechin serta sejumlah mineral seperti Zn, Se, Mo, Ge dan Mg.

Pengujian isolat meliputi uji morfologi, uji biokimia (pengecatan gram dan katalase), uji pertumbuhan pada kadar garam dan suhu tertentu. Tabel 1 menunjukkan hasil identifikasi bakteri asam laktat pada kombucha rosella

Isolasi bakteri asam laktat

Penelitian ini diawali dengan isolasi bakteri asam laktat. Koloni dari bakteri tersebut akan menunjukkan zona jernih di sekeliling koloni pada media MRS agar ditambah CaCO_3 1 % dan Natrium azida (sebagai penghambat pertumbuhan bakteri gram negatif). Kombucha rosella hasil fermentasi digoreskan pada media MRS agar, koloni yang menunjukkan zona jernih dimurnikan dengan media yang sama, sampai diperoleh koloni yang seragam dari segi morfologi.



Gambar 1. Koloni bakteri asam laktat pada media MRS+ CaCO_3

Hasil pemurnian diperoleh 18 isolat murni yang diduga sebagai bakteri asam laktat secara morfologis berbentuk bulat dan batang, (tabel 1).

Uji morfologi

Setelah dipastikan bahwa isolat masih murni, dilakukan pengecatan gram isolat dengan metode yang sederhana. Isolat diinokulasi pada media MRS *broth* dengan umur 18-24 jam, kemudian dilakukan pewarnaan cat gram A, gram B, gram C dan gram D. 18 isolat setelah dilakukan pengecatan gram, 11 isolat menunjukkan gram positif (+) sedang 9 isolat gram negatif. Bakteri asam laktat merupakan bakteri gram positif. Selanjutnya, isolat yang menunjukkan gram positif dilakukan uji lanjutan yaitu uji pertumbuhan pada beberapa kadar garam (6,5 % dan 18 %) dan suhu pertumbuhan (37°C dan 45°C). Hasil yang menunjukkan gram negatif tidak diuji lebih lanjut, karena bakteri asam laktat menunjukkan gram positif pada uji pengecatan gram.

Uji katalase dilakukan bersamaan dengan uji pengecatan gram. Bakteri asam laktat menunjukkan katalase negatif. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan kultur dengan H_2O_2 3 %, katalase positif akan menunjukkan gelembung setelah ditetesi.

Uji morfologi dilakukan bersamaan dengan uji pengecatan gram. Uji morfologi dilakukan pada isolat umur muda (18-24 jam), dengan cara meneteskan 1 ose kultur dengan metilen *blue*. Metilen *blue* akan memperjelas bentuk bakteri. Bakteri asam laktat memiliki ciri bentuk morfologi bulat, bulat rantai, bulat berpasangan, batang, batang rantai. Hasil uji morfologi pada 18 isolat menunjukkan 4 isolat bentuk bulat dan 14 isolat bentuk batang.

Uji Biokimia

Selanjutnya dilakukan uji pertumbuhan isolat pada suhu 37°C dan 45°C . Hasil uji pertumbuhan pada suhu 37°C dan 45°C menunjukkan 11 isolat, mampu tumbuh pada suhu tersebut, yang ditunjukkan oleh media pertumbuhan yang keruh karena adanya pertumbuhan bakteri. Bakteri asam laktat mampu tumbuh pada

suhu 37 °C dan 45 °C, sehingga 11 isolat semuanya merupakan bakteri asam laktat (tabel 1).

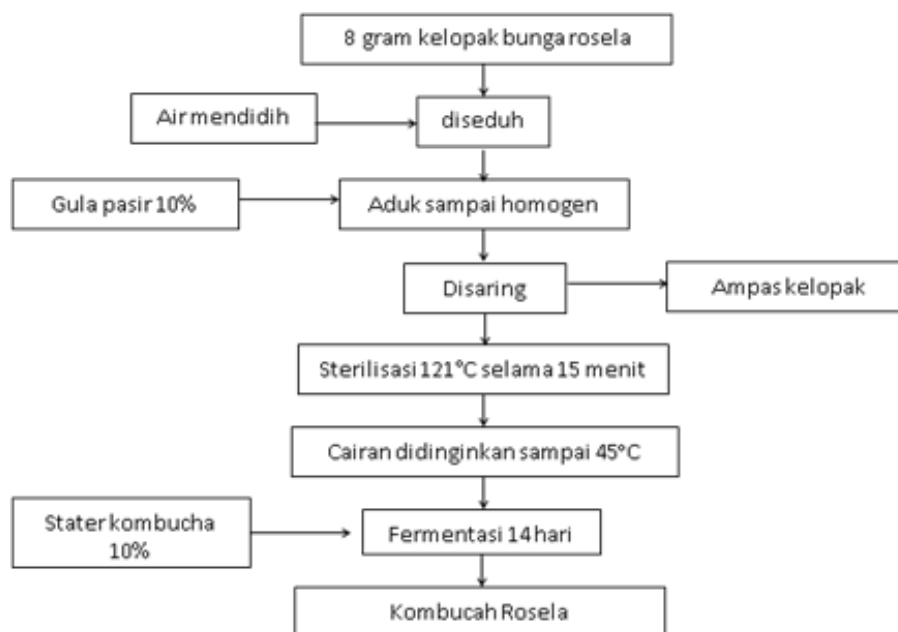
Uji selanjutnya adalah uji pertumbuhan pada kadar garam 6,5 % dan 18 %. Media yang digunakan adalah MRS *broth* dengan kadar garam 6,5 % dan 18 %. Hasil menunjukkan 8 isolat dari 11 isolat mampu tumbuh pada kadar 6,5 %. Sehingga diduga merupakan bakteri asam laktat. Bakteri asam laktat mampu tumbuh pada kadar garam yang tinggi, karena sebagian besar bakteri asam terhambat dengan adanya garam. Sedang kadar garam 18 % semua isolat tidak mampu tumbuh. Gambar 7 menunjukkan pertumbuhan isolat pada kadar garam 6,5 % dan 18 %.

Uji Fenotip dengan API 50 CHL kit

Berdasarkan hasil identifikasi (tabel 1), dari 18 isolat diperoleh 8 isolat yang menunjukkan ciri-ciri bakteri asam laktat. 11 isolat bukan merupakan bakteri asam laktat. Uji fenotip dilakukan dengan menggunakan API 50 CHL kit, yaitu dengan meneteskan 1 ml isolat (umur 24 jam) pada sumuran API 50 CHL kit.

Sumuran API 50 CHL kit terdiri dari 50 sumuran dengan 49 macam sumber karbon dan 1 sumuran sebagai kontrol. Setelah ditetesi dengan sampel, diinkubasi selama 24 jam. Hasil yang diperoleh adalah warna sumuran berubah menjadi ungu/biru tua, dengan indikasi isolat mampu memetabolisme sumber karbon pada sumuran tersebut. Sedang warna kuning, mengindikasikan bahwa isolat tidak mampu memetabolisme sumber karbon pada sumuran. Hasil analisis diolah dengan database apiweb.biomerieux.com untuk mengkonfirmasi kesamaan spesies dari isolat tersebut dengan database.

Berdasarkan analisis ciri-ciri genera menunjukkan bahwa ke-8 isolat merupakan bakteri asam laktat dari genera *Lactobacillus* (dengan bentuk batang) dan *Lactococcus* (dengan bentuk bulat). Isolat nomor 2, 6, 11 dan 18 berdasarkan database [apiweb](http://apiweb.biomerieux.com), memiliki kedekatan dengan spesies *Lactobacillus delbrueckii*. Isolat nomor 1, 3, 14 dan 17, berdasarkan database [apiweb](http://apiweb.biomerieux.com) memiliki kedekatan dengan *Lactococcus lactis*.



Gambar 2 Diagram alir pembuatan kombucha rosela

Tabel 1. Hasil identifikasi Bakteri pada Kombucha Rosella

No	Kode	Bentuk	Katalase	Gram	Pertumbuhan pada Suhu		Pertumbuhan dengan kadar garam		Produksi gas	Spesies	BAL/Non BAL
					37°C	45°C	6,5%	18%			
1	1.1	Bulat	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i>	
2	1.2	Batang	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
3	1.3	Bulat	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i>	
4	1.4	Batang	+	+							Non BAL
5	1.5	Batang	-	+	+	+	-	-	+		Non BAL
6	1.6	Batang	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
7	1.7	Batang	-	-							Non BAL
8	1.8	Batang	-	-							Non BAL
9	1.9	Batang	-	+	+	+	-	-	+		Non BAL
10	1.10	Batang	+	+							Non BAL
11	2.1	Batang	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
12	2.2	Batang	-	+	+	+	-	-	+		Non BAL
13	2.3	Batang	+	-							Non BAL
14	2.4	Bulat	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i>	
15	2.5	Batang	+	-							Non BAL
16	2.6	Batang	+	-							Non BAL
17	2.7	Bulat	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactococcus lactis</i>	
18	2.8	Batang	-	+	+	+	+	-	+	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	

Ciri genus *Lactobacillus* hasil penelitian ini adalah berbentuk batang, gram positif, katalase negatif, mampu tumbuh pada suhu 37 °C dan 45 °C serta tahan terhadap kadar garam tinggi (6,5 % dan 18 %). Ciri genus *Lactococcus* hasil penelitian ini adalah berbentuk bulat, gram positif, katalase negative, mampu tumbuh pada suhu 37 °C dan 45 °C serta tahan terhadap kadar garam tinggi (6,5 % dan 18 %).

Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Jayabalan *et al.* (2014) yang mengidentifikasi *Lactobacillus* pada teh kombucha mendominasi 30 % dari mikroorganisme. Hasil penelitian Marsh *et al.* (2014) menunjukkan bahwa ekstraksi DNA pelikel selulosa kombucha dari 5 lokasi geografis, terdeteksi profil yang berbeda. Genus bakteri utama adalah *Gluconacetobacter* (>85 %) dan *Lactobacillus* populasi juga diidentifikasi (hingga 30 %) dengan jumlah genus subdominan yang belum terdeteksi sebelumnya pada kombucha.

Penelitian sejenis telah dilakukan Mukadam *et al.* (2016) dan mengidentifikasi bakteri asam asetat dari kombucha (fermentasi *black tea*) dengan menggunakan media selektif *Glucose yeast extract broth*. Analisis biokimia mengkonfirmasi keberadaan organisme dari genus *Acetobacter*. Ragi tidak teridentifikasi oleh dalam analisis biokimia. Karakterisasi molekuler dari isolat mengidentifikasi bakteri asam asetat sebagai *Komagataeibacter saccharivorans* dan ragi sebagai *Zygosaccharomyces*.

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan adanya perbedaan jenis bakteri yang dapat diisolasi pada kombucha. Hal tersebut sejalan dengan pernyataan Vina *et al.* (2013), yang menyatakan bahwa variabel fermentasi proses, seperti waktu, suhu dan konsentrasi sukrosa, akan mempengaruhi konsentrasi produk akhir zat organik seperti asam dan pH. Turunnya pH akan menekan jumlah sel patogen, sehingga akan mempengaruhi komposisi mikroflora yang berkembang dalam kombucha. Penurunan pH pada kombucha dengan substrat yang berbeda

akan mempengaruhi jenis mikrobia yang dapat diisolasi.

Beberapa hasil penelitian juga menunjukkan bahwa kombucha dari bahan baku yang berbeda akan memberikan profil mikroflora yang berbeda pula, sehingga hasil penelitian ini merupakan suatu temuan tentang jenis bakteri yang berkembang pada kombucha dengan bahan dasar kelopak bunga rosella. pH awal dari teh kelopak bunga rosella yang asam akan mempengaruhi jenis mikroflora yang berkembang.

Hasil penelitian Marsh *et al.* (2014) dan Vina *et al.* (2013) mengidentifikasi mikroflora pada kombucha dari daun teh antara lain adalah Genus *Azetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus sp*, *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Bifidobacterium sp*, *Thermus sp*, *Allobacillum sp*, *Enterococcus sp*, *Propionilbacterium sp*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custerii*, *Candida sp.*, *Pichia membranaefaciens*, *Kloeckera apiculata* dan *Torulopsis sp*. Tabel

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri asam laktat yang dapat diisolasi dan diidentifikasi dari kombucha rosela adalah *Lactobacillus delbrueckii* dan *Lactococcus lactis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Kemenristek-DIKTI yang telah memberikan bantuan dana dalam program Hibah Bersaing tahun 2018, sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., L, J. 2014. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage. *Food Sci Technol-Brazil*, 34, 123–126. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612014005000012>
- Fu, C., Yan, F., Cao, Z., Xie, F., Lin, J. 2014. Antioxidant activities of kombucha prepared from three different substrates and changes in content of probiotics during storage, 2013(006227), 123–126.
- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Lonca, E.S., S, M. 2014. A review on kombucha tea—microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Compr Rev Food Sci F*, 13, 538–550. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12073>
- Leal, J.M., Suarez, L.V., Jayabalan, R., Oros, J.H., A, A. 2018. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA–J Food*, 16, 390–399. <https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499>
- Marsh, A.J., Sullivan, O.O., Hill, C., Ross, P.P., C, P. 2014. Sequence-Based Analysis of The Bacterial and Fungal Compositions of Multiple Kombucha (Tea Fungus) Samples. *Food Microbiology*, 38, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.003>
- Mukadam, T.A., Punjabi, K., Deshpande, S.D., V, S., C, A. 2016. Isolation and Characterization of Bacteria and Yeast from Kombucha Tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 32–41.

- <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.506.004>
- Naland, H. 2004. *Kombucha Teh Ajaib Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit*. Jakarta: Media Pustaka.
- Nguyen, N.K., Dong, N.T.N., Nguyen, H.T., L, P. 2015. Lactic Acid Bacteria: Promosing Supplement for Enhancing the Biological Activities of Kombucha. *SpringerPlus*, 4, 91. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0872-3>
- Puspawati, N.N., A, N. 2016. viability of lactic acid bacteria isolated from kombucha tea against low ph and bile salt. *Media Ilmiah Teknologi Pangan*, 3(1), 18–25. <https://doi.org/ojs.unud.ac.id/index.php/pangan/article/view/23166>
- Rahayu, E.S., Margino, S. 1997. *Materi workshop :Bakteri Asam Laktat,Isolasi dan Identifikasi*. Yogyakarta.
- Suharja, A.S., Henriksson, A., L, S. 2012. Impact of *saccharomyces cerevisiae* on viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in fermented milk under ambient conditions. *J Food Process Pres*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00780.x>
- Vina, I., Linde, R., Patetko, A., S, P. 2013. Glucuronic acid from fermented beverages: Biochemical functions in humans and its ole in health protection. *International Journal of Recent Research and Applied Studies*, 14, 17–25.
- Wang, K., Gan, X., Tang, X., Wang, S., T, H. 2010. Determination of D-Saccharic Acid-1,4-Lactone from Brewed Kombucha Broth by High-Performance Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci*, 878, 371–374. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.12.003>
- Watawana, M.I., Jayawardena, N., Gunawardhana, C.B., Waisundara, V.Y. 2015. *Health , Wellness , and Safety Aspects of the Consumption of Kombucha*, 2015.
- Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Li, Y., L, T. 2010. Symbiosis Between Microorganism from Kombucha and Kefir: Potential Significance to The Enhancement of Kombucha Function. *Appl Biochem Biotechnol*, 160, 446–455. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8361-6>

AUTHOR GUIDELINES

Term and Condition

1. Types of paper are original research or review paper that relevant to our Focus and Scope and never or in the process of being published in any national or international journal
2. Paper is written in good Indonesian or English
3. Paper must be submitted to <http://journal.trunojoyo.ac.id/agrointek/index> and journal template could be download here.
4. Paper should not exceed 15 printed pages (1.5 spaces) including figure(s) and table(s)

Article Structure

1. Please ensure that the e-mail address is given, up to date and available for communication by the corresponding author
2. Article structure for original research contains

Title, The purpose of a title is to grab the attention of your readers and help them decide if your work is relevant to them. Title should be concise no more than 15 words. Indicate clearly the difference of your work with previous studies.

Abstract, The abstract is a condensed version of an article, and contains important points of introduction, methods, results, and conclusions. It should reflect clearly the content of the article. There is no reference permitted in the abstract, and abbreviation preferably be avoided. Should abbreviation is used, it has to be defined in its first appearance in the abstract.

Keywords, Keywords should contain minimum of 3 and maximum of 6 words, separated by semicolon. Keywords should be able to aid searching for the article.

Introduction, Introduction should include sufficient background, goals of the work, and statement on the unique contribution of the article in the field. Following questions should be addressed in the introduction: Why the topic is new and important? What has been done previously? How result of the research contribute to new understanding to the field? The introduction should be concise, no more than one or two pages, and written in present tense.

Material and methods, “This section mentions in detail material and methods used to solve the problem, or prove or disprove the hypothesis. It may contain all the terminology and the notations used, and develop the equations used for reaching a solution. It should allow a reader to replicate the work”

Result and discussion, “This section shows the facts collected from the work to show new solution to the problem. Tables and figures should be clear and concise to illustrate the findings. Discussion explains significance of the results.”

Conclusions, “Conclusion expresses summary of findings, and provides answer to the goals of the work. Conclusion should not repeat the discussion.”

Acknowledgment, Acknowledgement consists funding body, and list of people who help with language, proof reading, statistical processing, etc.

References, We suggest authors to use citation manager such as Mendeley to comply with Ecology style. References are at least 10 sources. Ratio of primary and secondary sources (definition of primary and secondary sources) should be minimum 80:20.

Journals

Adam, M., Corbeels, M., Leffelaar, P.A., Van Keulen, H., Wery, J., Ewert, F., 2012. Building crop models within different crop modelling frameworks. *Agric. Syst.* 113, 57–63. doi:10.1016/j.agsy.2012.07.010

Arifin, M.Z., Probowati, B.D., Hastuti, S., 2015. Applications of Queuing Theory in the Tobacco Supply. *Agric. Sci. Procedia* 3, 255–261. doi:10.1016/j.aaspro.2015.01.049

Books

Agrios, G., 2005. *Plant Pathology*, 5th ed. Academic Press, London.