

Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Mikroorganisme pada Proses Fermentasi Kombucha Berbahan Baku Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

Anita Herawati Permana^{1*)}, Eva Yuliana¹, Indah Aulia Nurhalisa¹

¹)Program Studi Penjaminan Mutu Industri Pangan, Politeknik AKA Bogor
Jl. Pangeran Sogiri No.283, Tanah Baru, Bogor Utara, Kota Bogor, Jawa Barat 16154

^{*)}Email: anitahera@gmail.com

(Received : 7 November 2021; Accepted: 14 Desember 2021; Published: 21 Desember 2021)

Abstrak

Kombucha merupakan minuman fungsional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan starter kultur kombucha. Starter kultur kombucha berbentuk lembaran selulosa yang tersusun atas banyak bakteri dan khamir. Jenis bakteri dan khamir yang terlibat dalam proses fermentasi kombucha sangat bervariasi sehingga perlu diidentifikasi keanekaragamannya. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi morfologi mikroorganisme selama proses fermentasi kombucha berbahan baku teh hijau. Fermentasi kombucha dilakukan selama 14 hari. Pengukuran pH dilakukan setiap hari untuk menentukan fase-fase fermentasi. Isolasi mikroorganisme dilakukan dari cairan kombucha pada tiap fase fermentasi. Seluruh isolat mikroorganisme yang diperoleh dikarakterisasi melalui pengamatan secara morfologi, pewarnaan sederhana, pewarnaan gram, pewarnaan spora, dan uji motilitas. Berdasarkan hasil yang diperoleh, pada cairan kombucha tidak ditemukan adanya khamir. Jenis mikroorganisme yang diperoleh dari cairan kombucha adalah bakteri. Hasil karakterisasi mikroorganisme menyiratkan bahwa empat dari enam isolat bakteri yang diperoleh memiliki kemiripan dengan genus *Acetobacter*, dengan ciri-ciri berbentuk batang pendek, tidak memiliki spora, bersifat motil, dan termasuk ke dalam bakteri Gram negatif.

Kata kunci: *Acetobacter*; Fermentasi; Kombucha; Ragi

Abstract

*Kombucha is a functional beverage made from tea and sugar that is fermented using a kombucha starter culture. Kombucha starter cultures are cellulose fiber sheets composed of many bacteria and yeasts. The bacteria and yeasts in kombucha fermentation are very diverse, so it is necessary to identify the diversity. In this study, the isolation and characterization of microorganisms were carried out during the fermentation process of green tea-based kombucha. Kombucha fermentation was carried out for 14 days. pH measurements were taken everyday to determine the fermentation phase. Microorganisms were isolated from the kombucha liquid in each fermentation phase. All obtained microorganisms were characterized by morphological observations, simple staining, Gram staining, endospore staining, and motility tests. Based on the results, there was no yeast found in kombucha liquid. The type of microorganism obtained from kombucha liquid was bacteria. Characterization results suggested that four of the six isolates met the requirements of *Acetobacter*, i.e., short rods, not having spores, being motile, and belonging to Gram-negative bacteria.*

Keywords: *Acetobacter*; Fermentation; Kombucha; Yeast

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang mampu menghasilkan komoditas teh (*Camellia sinensis*) dalam jumlah besar. Teh memiliki cita rasa tinggi dan dapat diolah menjadi berbagai macam minuman, salah satunya adalah kombucha. Kombucha merupakan minuman fungsional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan starter kultur kombucha yang tersusun atas *Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir (Frank, 1995).

Selain *Acetobacter xylinum*, bakteri yang terdapat dalam kombucha diantaranya adalah *Acetobacter ketogenum* dan *Bacterium gluconicum*. Sementara khamir yang terdapat dalam kombucha adalah *Candida albicans*, *Saccharomyces*, *Pichia fermentans* (Anugrah, 2015), *Brettanomyces*, dan *Zygosaccharomyces* (Suhardini dan Elok, 2016).

Kombucha dipercaya memiliki beberapa efek kesehatan antara lain sebagai antioksidan,

memperbaiki mikroflora usus, dapat meningkatkan ketahanan tubuh, menurunkan tekanan darah (Wistiana dan Elok, 2015), menurunkan berat badan, menormalkan fungsi organ-organ tubuh, mengobati asam urat, dan mencegah kanker (Frank, 1995). Kombucha mengandung berbagai jenis asam organik seperti asam glukuronat, asam glukonat, asam asetat, asam folat, asam amino, vitamin, dan zat lainnya. Waktu fermentasi kombucha berkisar antara 8-12 hari pada suhu 18-20°C, sedangkan pada suhu yang lebih tinggi fermentasi berlangsung lebih singkat. Pada umumnya, daerah beriklim tinggi (22-26°C) melakukan fermentasi kombucha selama 4-6 hari (Wistiana dan Elok, 2015).

Fermentasi kombucha dengan bantuan mikroorganisme terbagi menjadi beberapa tahapan, yaitu konversi gula menjadi etanol, konversi etanol menjadi asam asetat, dan konversi sebagian asam asetat menjadi karbon dioksida yang menghasilkan sensasi minuman bersoda dalam kombucha. Adanya kondisi yang berbeda pada tiap fase fermentasi akan mempengaruhi jenis mikroorganisme yang terdapat dalam kombucha. Saat ini, belum ditemukan penelitian yang mengungkapkan tentang keanekaragaman mikroorganisme selama proses pembuatan kombucha. Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi morfologi mikroorganisme pada proses fermentasi kombucha berbahan baku teh hijau (*Camellia sinensis*). Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh profil perubahan pH selama proses fermentasi kombucha, memperoleh koleksi isolat mikroorganisme pada proses fermentasi kombucha, dan mengidentifikasi isolat mikroorganisme yang diperoleh melalui metode identifikasi klasik secara morfologi.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan diantaranya daun teh hijau, gula pasir, air, aquades, SCOBY, aquades, media PCA (*plate count agar*), media SIM (*sulfide indole motility*), media NA (*nutrient agar*), natrium asetat 0,02 M, asam asetat 0,02 M, safranin, kristal violet, malasit hijau, alkohol 95%, dan larutan lugol.

Pembuatan kombucha dilakukan berdasarkan prosedur dari Naland (2004). Analisis pH kombucha dilakukan dari hari satu (1) hingga hari empat belas (14). Pengukuran pH berdasarkan SNI 06-6989.11-2004 (Badan Standardisasi Nasional, 2004).

Isolasi mikroorganisme dari cairan kombucha dilakukan dengan metode pengenceran bertahap. Koloni yang tumbuh diamati warna, ukuran, dan bentuknya. Koloni tunggal hasil isolasi dipindahkan dengan ose bulat ke dalam media agar miring (Sabdaningsih dkk., 2013).

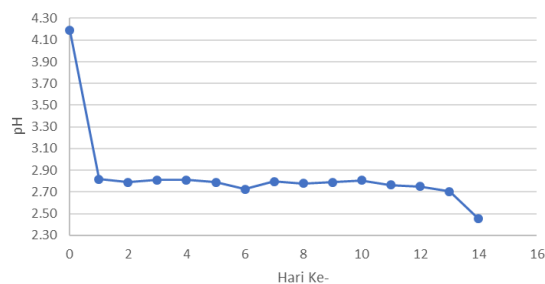
Seluruh isolat mikroorganisme yang diperoleh dilakukan pewarnaan sederhana, pewarnaan gram, pewarnaan spora (Sabdaningsih dkk., 2013), dan uji motilitas (Harley, 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil Nilai pH Kombucha

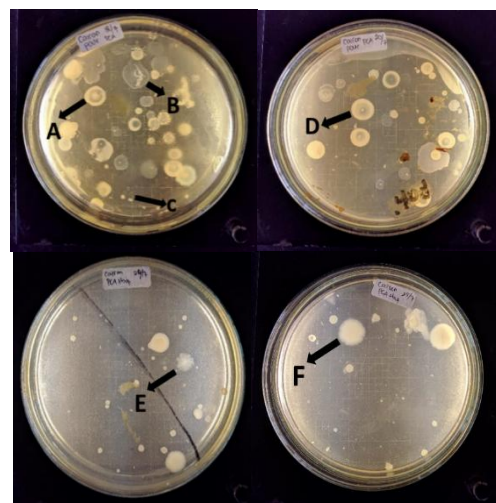
Kombucha merupakan minuman hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan starter kultur kombucha. Salah satu indikator bahwa proses fermentasi telah berlangsung adalah adanya penurunan nilai pH. Perubahan nilai pH kombucha dapat dilihat pada Gambar 1.

Nilai pH kombucha mengalami penurunan yang signifikan pada awal proses fermentasi. Pada awal fermentasi, pH larutan adalah 4,18 kemudian setelah 24 jam fermentasi pH turun menjadi 2,81. Selanjutnya nilai pH cenderung stabil sampai hari terakhir proses fermentasi yaitu 2,46.



Gambar 1. Profil Nilai pH Kombucha Selama Proses Fermentasi

Penurunan pH disebabkan oleh aktivitas metabolisme mikroorganisme selama proses fermentasi yang salah satunya adalah pembentukan *by product* berupa asam. Hal ini sesuai senada pernyataan Junior *et al.* (2009), bahwa selama awal proses fermentasi, penurunan pH disebabkan oleh bakteri dan *yeast* yang mengubah sukrosa menjadi asam organik. Frank (1995), menyatakan bahwa asam organik yang dihasilkan selama proses fermentasi kombucha diantaranya adalah asam glukuronat, asam asetat, asam laktat, asam folat, dan asam amino.



Gambar 2. Hasil Pengamatan Morfologi Isolat A, B, C, E, dan F

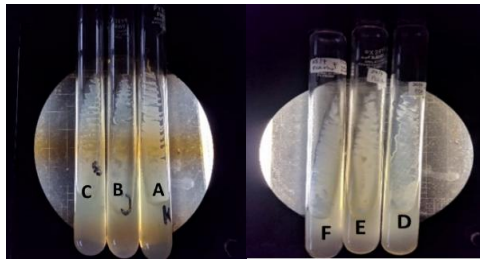
Karakterisasi Isolat

Identifikasi dan karakterisasi bakteri memerlukan isolat atau biakan murni yang diperoleh

dari isolasi mikroorganismenya. Hasil biakan mikroorganismenya yang ditumbuhkan pada media dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil isolasi yang didapat dari proses fermentasi kombucha sebanyak 6 isolat. Karakteristik morfologi 6 isolat tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari keenam isolat yang didapatkan, secara morfologi dapat diidentifikasi bahwa kesemuanya adalah bakteri. Keenam isolat tersebut selanjutnya dimurnikan kedalam media NA miring. Hasil pertumbuhan bakteri pada media agar miring NA adalah arboresen atau tumbuh seperti pohon dan dapat dilihat pada Gambar 3.

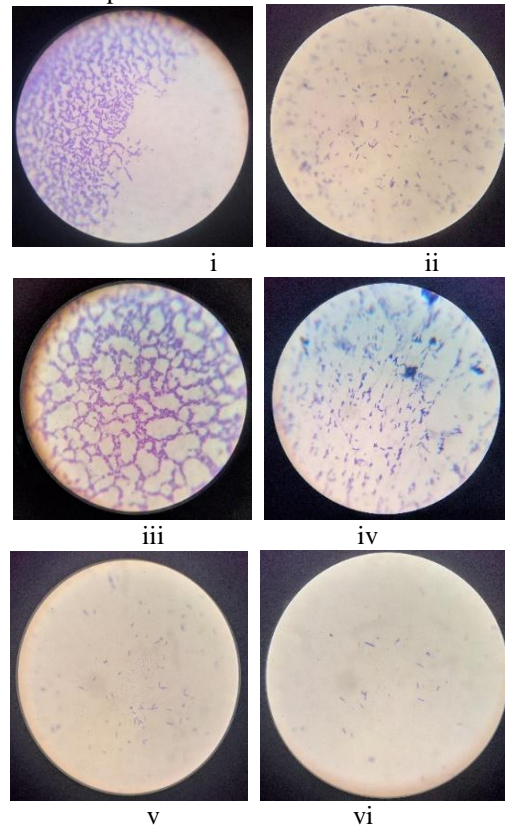


Gambar 3. Pertumbuhan biakan murni, Isolat C, B, A, F, E, D pada media agar miring NA

Isolat yang dimurnikan dipilih berdasarkan perbedaan kenampakan morfologi koloni, baik dari segi warna, elevasi, tekstur permukaan, garis-garis radial, lingkaran konsentris maupun tetes eksudat sehingga diperoleh isolat murni (Ed-Har *et. al.*, 2017). Morfologi koloni isolat yang ditemukan pada penelitian ini sesuai dengan pernyataan Cappucino & Sherman (2011) bahwa pada umumnya bentuk koloni pada media agar lempeng adalah sirkuler, tak beraturan, dan rizoid. Elevasi dapat berbentuk datar, naik, cembung, dan umbonatus. Tepian dapat berbentuk mulus, bergelombang, bergerigi, lobatus, dan filiformis. Pada agar miring, pertumbuhan koloni adalah filiformis, ekinulatus, bermanik, menyebar, arboresen, dan rizoid.

Karakterisasi Morfologi Sel Bakteri

Keenam isolat yang didapatkan diamati karakteristik morfologi selnya melalui reaksi terhadap pewarnaan dan uji motilitas. Pewarnaan yang dilakukan pada isolat pada pengujian ini adalah sederhana, Gram, dan spora. Pewarnaan sederhana bertujuan untuk mengetahui ukuran serta bentuk bakteri, bakteri akan mengikat satu jenis pewarna tunggal yang diberikan. Hasil pewarnaan sederhana dapat dilihat pada Gambar 4.

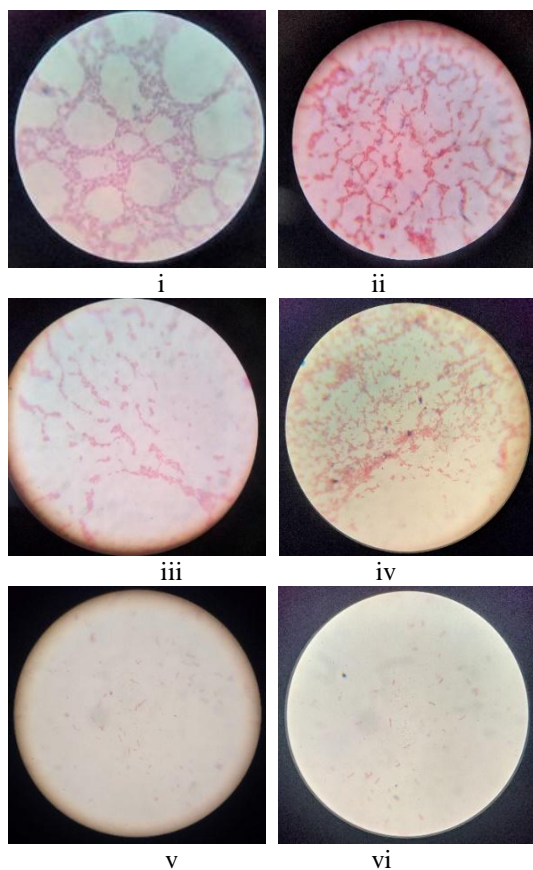


Gambar 4. Hasil Pewarnaan Sederhana pada Isolat (i) Isolat A, (ii) Isolat B, (iii) Isolat C, (iv) Isolat D, (v) Isolat E, (vi) Isolat F

Tabel 1. Karakteristik Morfologi Isolat Selama Proses Fermentasi Kombucha

Isolat	Bentuk	Tepian	Elevasi	Warna Isolat	Media
A	Tak beraturan	Bergelombang	Cembung	Putih keruh	PCA
B	Tak beraturan	Bergelombang	Datar	Putih jernih	PCA
C	Tak beraturan	Mulus	Datar	Putih jernih	PCA
D	Sirkuler	Bergerigi	Cembung	Putih keruh	PCA
E	Rizoid	Filamentus	Datar	Putih jernih	PCA pH 4
F	Sirkuler	Filamentus	Naik	Putih keruh	PCA pH 4

Pada Gambar 4, dapat dilihat bahwa keenam isolat memiliki kesamaan bentuk morfologi yaitu batang pendek yang tunggal, berpasangan, serta berkelompok. Bentuk morfologis sel bakteri diantaranya adalah kokus, basilus, dan spiral dan susunannya adalah rantai, berkelompok, berpasangan, dan tetrad. Dapat dikatakan bahwa keenam isolat tersebut memiliki bentuk sel basilus dengan susunan mono, diplo serta streptobasilus. Salah satu cara yang masih diperlukan dalam taksonomi bakteri menurut Campbell *et.al* (2000) diantaranya adalah pewarnaan Gram, cara ini digunakan untuk memisahkan anggota-anggota domain bakteri ke dalam dua kelompok berdasarkan dinding selnya. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang lebih sederhana, sedangkan bakteri Gram negatif lebih kompleks. Hasil pewarnaan Gram pada isolat dapat dilihat pada Gambar 5.

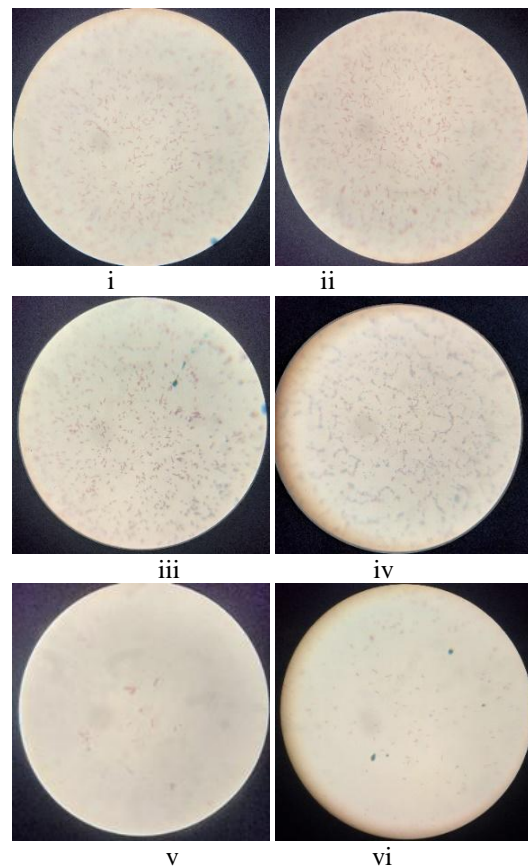


Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gram pada Isolat (i) Isolat A, (ii) Isolat B, (iii) Isolat C, (iv) Isolat D, (v) Isolat E, (vi) Isolat F

Berdasarkan hasil yang diperoleh, keenam isolat termasuk kedalam bakteri Gram negatif karena menunjukkan warna merah. Bakteri Gram positif hanya memiliki selapis dinding sel. Setelah pemberian alkohol 95% pori-pori pada dinding sel akan menyempit sehingga tidak akan terwarnai oleh pewarna tandingan dan akan menjaga pewarna primer. Bakteri Gram negatif merupakan bakteri

yang tidak mempertahankan atau menjaga zat warna primer. Bakteri ini memiliki tiga lapis dinding sel, lapisan terluarnya tercuci bersamaan dengan pewarna primer pada saat pencucian dengan alkohol, sehingga hasil akhirnya akan terwarnai dengan pewarna tandingan.

Pewarnaan ketiga adalah pewarnaan spora. Pewarnaan ini bertujuan untuk mengetahui kepemilikan spora pada bakteri. Hasil pewarnaan pada isolat memperoleh hasil seperti pada Gambar 6.

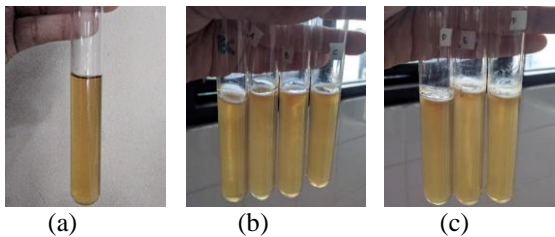


Gambar 6. Hasil Pewarnaan Spora pada Isolat (i) Isolat A, (ii) Isolat B, (iii) Isolat C, (iv) Isolat D, (v) Isolat E, (vi) Isolat F

Hasil pewarnaan spora menunjukkan bahwa hanya isolat A dan isolat D yang memiliki spora. Keberadaan spora teramati dari nampaknya bagian warna hijau pada bakteri, sedangkan keempat isolat lainnya hanya memiliki sel vegetatif yang berwarna merah. Safranin yang merupakan pewarna tandingan akan memberi warna merah kepada bagian sel bakteri selain endospora (Harley & Prescott 2002; Tortora *et. al*, 2010). Saat diwarnai oleh malasit hijau, sel vegetatif dapat mengikat warna tetapi dapat luntur karena ikatannya tidak kuat. Pada pewarnaan selanjutnya dengan safranin, sel vegetatif mudah mengikat warna kembali. Oleh karena itu, hasil pewarnaan akhir dari sel vegetatif adalah merah muda.

Uji Motilitas

Untuk melihat kemampuan organisme motil, maka dilakukan uji motilitas dengan menggunakan media agar SIM. Hasil uji motilitas bakteri positif dapat dilihat dengan adanya pertumbuhan bakteri pada permukaan media atau tidak hanya bekas pada tusukan, sedangkan bakteri non motil tumbuh sepanjang tusukan (Harley, 2005). Uji motilitas bakteri pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Pengamatan Uji Motilitas (a) media tanpa bakteri (b) Bakteri *E. Coli* (kontrol positif), Isolat A, B, C, (c) Isolat D, E, F.

Hasil uji motilitas pada keenam isolat yaitu motil. Bakteri *E. Coli* digunakan sebagai kontrol positif karena bakteri tersebut memiliki sifat motil. Hasil positif dapat dilihat dari tersebarnya pertumbuhan bakteri pada media SIM diluar area bekas tusukan. Kekeuhan pada permukaan media juga menunjukkan tersebarnya pertumbuhan dan pergerakan keenam isolat. Pengujian motilitas bertujuan untuk mengetahui kepemilikan flagela pada bakteri, sehingga dapat disimpulkan keenam isolat memiliki flagela.

Berdasarkan serangkaian uji yang dilakukan, ciri-ciri karakteristik morfologi yang ditemukan pada sebagian besar isolat dari kombucha memiliki kesamaan dengan genus *Acetobacter*. *Acetobacter* berbentuk elips hingga batang, lurus, atau ramping dan beberapa tipe dapat berbentuk bulat, memanjang, bengkok atau berfilamen. Sel *Acetobacter* memiliki susunan sel tunggal, berpasangan atau rantai, dapat motil atau nonmotil, tidak membentuk endospora, termasuk ke dalam bakteri Gram negatif, serta bersifat aerob. Pernyataan ini juga diperkuat dengan pernyataan Holt, *et. al*, (1994); Nainggolan (2009) bahwa genus *Acetobacter* memiliki sel berbentuk batang dan termasuk ke dalam golongan bakteri Gram negatif. Kondisi pH asam yang terbentuk pada proses fermentasi juga menunjukkan adanya kesamaan karakteristik dengan *Acetobacter*. Bakteri *Acetobacter* termasuk kelompok bakteri asam asetat, yang melalui proses oksidasi metil alkohol dapat menghasilkan asam asetat. Asam asetat inilah yang berfungsi sebagai penekan pertumbuhan mikroorganismenya lainnya, terutama mikroorganismenya yang bukan asidofilik.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pada fase cairan kombucha tidak ditemukan adanya khamir. Jenis mikroorganismenya yang diperoleh dari fase cairan kombucha adalah bakteri. Empat dari enam isolat bakteri memiliki kemiripan dengan genus *Acetobacter* karena memenuhi beberapa parameter pengujian karakteristik morfologi bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Anugrah, S.T. (2005). *Pengembangan Produk Kombucha Probiotik Berbahan Baku Teh Hitam (Camellia sinensis)*. Undergraduate thesis, Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Badan Standardisasi Nasional. (2004). *SNI 06-6989.11-2004: Air dan air limbah – Bagian 11: Cara Uji Derajat Keasaman (pH) dengan menggunakan alat pH meter*. Badan Standardisasi Nasional. ICS 13.060.50.
- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. (2002). *Biology* (5th ed). Alih Bahasa: Wasmen Manalu. Erlangga. Jakarta.
- Cappucino, J.G., & N. Sherman. (2014). *Manual Laboratorium Mikrobiologi* (Edisi Ke-8). Diterjemahkan oleh Nur Miftahurrahmah. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Frank, G.W. (1995). *Kombucha. Translated by Althea Tysndale* (8th Ed). Publishing House Ensthaler. Australia.
- Harley, J.P. (2005). *Laboratory Exercises in Microbiology* (Sixth Edition). The McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, & S.T. Williams. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th ed). Baltimore: Williams and Wilkins.
- Junior, R.J.S., R.A. Batista, S.A. Rodrigues, L.X. Filho, & A.S. Lima. (2009) Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kombucha Colonies. *Journal of Microbial & Biochemical Technology (JMBT)* 1:1.
- Nainggolan, J. (2009). *Kajian Pertumbuhan Bakteri Acetobacter sp. Dalam Kombucha Rosela Merah (Hibiscus sabdarifa) Pada Kadar Gula dan Lama Fermentasi Yang Berbeda*. Thesis, Sekolah Pasca Sarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Naland, H. (2004). *Kombucha Teh Ajaib Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Sabdaningsih, A., Anto B., Endang K. (2013). Isolasi dan Karakterisasi Morfologi Koloni Bakteri Asosiasi Alga Merah (*Rhodophyta*) dari Perairan Kutuh Bali. *Jurnal Biologi, Volume 2 No 2, Hal. 11-17*.
- Suhardini, P.N., Elok Z. (2016). Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha Dari Berbagai Jenis

- Daun Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 4 No 1 p.221-229.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2010). *Microbiology an introduction* (10th edition). Pearson edition, Inc., Publishing as Pearson Benjamins Cummings, San Francisco, 1301 Sansome.
- Wistiana, D., Elok Z. (2015). Karakteristik Kimiawi Dan Mikrobiologis Kombucha Dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* Vol. 3 No 4 p.1446-1457.