 DOI : 10.35311/jmpi.v11i2.978

Pengaruh Konsentrasi, Suhu dan Waktu Fermentasi Kombucha Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli*

Triyani Triyani, Ismi Rahmawati*, Ana Indrayati

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta

Sitasi: Triyani, T., Rahmawati, I., & Indrayati, A. (2025). Pengaruh Konsentrasi, Suhu, dan Waktu Fermentasi Kombucha Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Aktivitas Antibakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 11(2), 511–523.
<https://doi.org/10.35311/jmpi.v11i2.978>

Submitted: 24 September 2025

Accepted: 16 Desember 2025

Published: 25 Desember 2025

*Penulis Korespondensi:

Ismi Rahmawati

Email:

ismirahmawati@setiabudi.ac.id



Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

ABSTRAK

Kombucha menggunakan kultur simbiotik (SCOBY) memiliki aktivitas antibakteri. Fermentasi kombucha dipengaruhi konsentrasi, suhu dan waktu untuk mendapatkan produk metabolit. Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh suhu, waktu dan konsentrasi fermentasi kombucha rosella terhadap aktivitas antibakteri *E. coli*. Fermentasi kombucha rosella dilakukan dengan variasi konsentrasi 30, 40, dan 50%, suhu fermentasi 4, 25, dan 37°C, dan lama fermentasi 7, 14, dan 21 hari. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram dan dilusi. Pengamatan kebocoran ion dilakukan dengan *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AAS). Hasil penelitian menunjukkan pengaruh konsentrasi, suhu dan waktu, terhadap ketebalan SCOBY. Semakin tinggi konsentrasi, suhu dan waktu makin tebal SCOBY, hasil konsentrasi 50%, suhu 37°C dan waktu 21 hari menghasilkan ketebalan SCOBY 1,3 cm. Pengaruh konsentrasi, suhu dan waktu, terhadap pH dan % total asam. Semakin tinggi konsentrasi, suhu dan waktu makin tebal asam dan jumlah total asam makin meningkat. Pengaruh konsentrasi, suhu dan waktu, fermentasi kombucha rosella terhadap aktivitas antibakteri *E. coli* menunjukkan semua hasil fermentasi berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif. Kombucha yang difermentasi dengan konsentrasi 50% pada suhu 37°C selama 21 hari memiliki perbedaan signifikan dibanding kelompok lain dalam menghambat *E. coli* dengan nilai Sig. (p-value) < 0,05. Hasil uji aktivitas antibakteri kombucha uji teraktif pada fermentasi dengan konsentrasi 50%, suhu 37°C, hari ke-21 zona hambat sebesar 16,7 ± 0,10 mm. Konsentrasi Bunuh Minimal kombucha rosella pada konsentrasi 25%. Hasil AAS membuktikan adanya kebocoran membran sel dengan peningkatan ion K⁺ dan Ca²⁺ dibandingkan tanpa perlakuan.

Kata Kunci: Kombucha, Bunga Rosella, *Escherichia coli*, Fermentasi, Antibakteri

ABSTRACT

Kombucha from symbiotic culture (SCOBY), exhibits antibacterial activity. The fermentation of kombucha is influenced by concentration, temperature, and time to obtain metabolic products. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) flos contains bioactive compounds with antibacterial properties. This study aims to determine the effect of temperature, time, and concentration of rosella kombucha fermentation on antibacterial activity against *E. coli*. Rosella kombucha fermentation was conducted with variations in concentration (30, 40, and 50%), fermentation temperature (4, 25, and 37°C), and fermentation time (7, 14, and 21 days). Antibacterial activity testing was performed using the disk diffusion and dilution methods. Ion leakage observation was conducted using Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS). The results showed that concentration, temperature, and time affected SCOBY thickness. Higher concentration, temperature, and time resulted in thicker SCOBY, with the highest thickness (1.3 cm) achieved at 50% concentration, 37°C temperature, and 21 days of fermentation. Concentration, temperature, and time also affected pH and total acid percentage, with higher values resulting in increased acidity. The most active kombucha showed an inhibition zone of 16.7 ± 0.10 mm at 50% concentration, 37°C temperature, and 21 days of fermentation. The minimum bactericidal concentration of rosella kombucha was 25%. AAS results proved membrane leakage with increased K⁺ and Ca²⁺ ions compared to untreated samples.

Keywords: Kombucha, Rosella Flos, *Escherichia coli*, Fermentation, Antibacterial

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu permasalahan di bidang kesehatan yang terus berkembang dari waktu ke waktu, karena dapat menular dari satu individu ke individu lainnya. Infeksi dapat ditimbulkan oleh berbagai jenis mikroorganisme, antara lain virus, bakteri, jamur, dan protozoa. Salah satu bakteri penyebab infeksi yang umum ditemukan adalah *E. coli* (Fiana *et al.*, 2020). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melaporkan bahwa diare membunuh 100.000 balita setiap hari, membunuh 273 anak balita setiap hari, atau 11 jiwa per jam.

Infeksi bakteri *E. coli* merupakan salah satu penyebab utama penyakit gastrointestinal, seperti diare, dan infeksi saluran kemih. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) melaporkan bahwa resistensi antibiotik pada bakteri patogen, termasuk *E. coli*, terus meningkat secara global, menyebabkan efektivitas antibiotik konvensional semakin menurun (WHO, 2020).

Diare tetap menjadi penyebab utama kematian pada system Registrasi Sampel tahun 2018, yang menyumbang 7% kematian pada neonates dan 6% pada bayi di bawah usia 28 hari. Tahun 2021, inklusi pelayanan pada korban BAB pada semua umur sebesar 33,6% dan balita sebesar 23,8% dari target yang ditetapkan. Perbedaan provinsi terbesar adalah 6,7% di Sumatra Utara dan 68,6% di Banten, dan perbedaan provinsi terkecil adalah 3,3% di Sumatra Utara dan 55,3% di Banten (Kemenkes RI, 2017).

Penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak sesuai aturan dapat menyebabkan bakteri membangun mekanisme resistensi. Peningkatan pada resistensi antibiotik menimbulkan ancaman global terhadap kesehatan manusia dan diperlukan penemuan alternatif antimikroba yang efektif. Salah satu bakteri yang telah menjadi masalah utama dalam resistensi adalah bakteri *E. coli* patogen yang merupakan penyebab berbagai sindrom klinis: infeksi saluran kemih, penyakit enterik/diare, dan meningitis. Mekanisme utama Dimana *E. coli* menyebabkan penyakit enterik meliputi perlekatan dan kolonisasi pada mukosa usus, manipulasi sitoskeleton sel inanga tau menghindari pertahan imun inang, dan produksi racun (Abdelhamid *et al.*, 2018).

Rosella merupakan salah satu alternatif pengobatan yang memiliki beragam aktivitas farmakologis, antara lain antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, antidiabetes, antihipertensi, dan antifungal (Chofidah *et al.*, 2019). Aktivitas antimikroba pada bunga rosella berasal dari kandungan senyawa polifenol, seperti flavonoid (termasuk antosianin dan gosipetin), senyawa fenolik, tanin, serta saponin (Estri & Anggarbeni, 2015). Penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Jung *et al.* (2013) menunjukkan bahwa kandungan polifenol dalam ekstrak bunga rosella mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Sementara itu, penelitian yang dilakukan oleh Higginbotham *et al.* (2014) menunjukkan bahwa senyawa fenolik dan antosianin pada rosella memiliki kemampuan memengaruhi pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Senyawa flavonoid diketahui berperan sebagai antibakteri dengan mekanisme menghentikan

pertumbuhan sel bakteri. Saponin bekerja dengan menurunkan tegangan permukaan sel, sehingga mengakibatkan lisis pada bakteri. Tanin dapat menyebabkan pengerutan pada dinding sel, sedangkan antibiotik kotrimoksazol pada konsentrasi 10%–70% dilaporkan bersifat resisten dengan diameter zona hambat tertentu (Estri & Anggarbeni, 2015). Senyawa fenolik dalam tanaman dapat menyebabkan kerusakan pada membrane sel bakteri (Teerarak *et al.*, 2017).

Kombucha adalah minuman hasil fermentasi yang dibuat dari campuran teh, gula, serta kultur simbiotik antara bakteri dan ragi (SCOBY). Minuman ini dikenal memiliki berbagai manfaat kesehatan, termasuk aktivitas antibakteri, antijamur, dan antioksidan (Vina *et al.*, 2020). Kombucha telah menjadi populer sebagai minuman kesehatan alami di seluruh dunia. Aktivitas antibakteri kombucha penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kombucha memiliki aktivitas antibakteri terhadap berbagai patogen, termasuk *E. coli*.

Penelitian yang secara spesifik mengkaji efek fermentasi kombucha berbasis bunga rosella terhadap aktivitas antibakteri, terutama terhadap *E. coli*, masih sangat terbatas. Proses fermentasi pada kombucha melibatkan interaksi kompleks antara bakteri asam asetat, ragi, dan gula. Ragi mengubah gula menjadi alkohol, sementara bakteri mengubah alkohol menjadi asam asetat, memberikan rasa asam yang khas. Proses ini juga menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang berkontribusi pada manfaat kesehatan kombucha (Jayabalan *et al.*, 2014).

Faktor yang mempengaruhi fermentasi kombucha berbasis bunga rosella pada penelitian ini yaitu ada beberapa faktor suhu, waktu fermentasi, dan rasio bahan baku dapat mempengaruhi hasil fermentasi kombucha. Setiap mikroorganisme memiliki rentang suhu optimal untuk pertumbuhannya. Jika suhu terlalu rendah, aktivitas mikroorganisme akan melambat, sementara suhu yang terlalu tinggi dapat membunuh mikroorganisme atau merusak enzim yang diperlukan dalam proses fermentasi (Süle *et al.*, 2014).

Penelitian mengenai kombucha berbasis bunga rosella telah berkembang dalam beberapa tahun terakhir, terutama terkait kandungan fitokimia, aktivitas antioksidan, dan potensi antibakterinya. Namun demikian, studi yang secara komprehensif memetakan interaksi tiga faktor proses fermentasi, yaitu konsentrasi substrat, suhu fermentasi, dan lama fermentasi, terhadap potensi antibakteri kombucha rosella masih sangat terbatas. Sebagian besar penelitian terdahulu hanya menilai satu faktor secara tunggal atau dua faktor secara parsial, sehingga belum menggambarkan efek simultan dan hubungan interaktif antarvariabel proses yang dapat memengaruhi produksi komponen bioaktif seperti asam organik dan polifenol (Rahman & Indarto, 2020; Setyawati *et al.*, 2021).

Fermentasi kombucha berbasis bunga rosella dengan perbedaan konsentrasi, suhu dan waktu berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri *E. coli*. Terdapat perlakuan konsentrasi, suhu, dan waktu fermentasi yang menghasilkan aktivitas antibakteri terbaik

pada kombucha bunga rosella. Aktivitas antibakteri kombucha rosella teraktif memiliki mekanisme kerja kebocoran ion pada membran *E. coli*. Untuk mengetahui seberapa besar kontribusi perubahan konsentrasi rosella terhadap peningkatan atau penurunan aktivitas antibakteri *E.coli*. perbedaan waktu dan konsentrasi Interaksi tiga arah menunjukkan apakah efek kombinasi waktu, konsentrasi dan suhu berubah.

Selain itu, sebagian besar uji antibakteri kombucha belum menerapkan standar metode pengujian internasional, seperti pedoman Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) yang mengatur konsentrasi inokulum, media, waktu inkubasi, serta interpretasi zona hambat. Ketidakterpaduan metode ini menyebabkan variasi hasil antar penelitian sulit dibandingkan dan mengurangi kekuatan interpretasi ilmiah (CLSI, 2020). Lebih lanjut, penelitian yang mengkaji mekanisme antibakteri kombucha rosella umumnya masih terbatas pada pengukuran zona hambat, tanpa memasukkan indikator mekanistik yang relevan, seperti kebocoran ion sel bakteri. Padahal, kebocoran ion (K^+ atau Ca^{2+}) merupakan salah satu indikator penting kerusakan membran yang dapat menjelaskan mekanisme aksi antibakteri secara lebih mendalam (Sari & Wiyono, 2019).

METODE PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan meliputi inkubator, laminar air flow, mikropipet beserta tips steril, autoklaf, pH meter, timbangan analitik, alat gelas, kertas cakram antibakteri (*disk diffusion*), toples kaca, jangka sorong, hotplate, magnetic stirrer, *McFarland densitometer*, *bio safety cabinet*, bunsen, alat pemanas teh, mikroskop, AAS *Thermo Elemental* tipe Solar MS.

Bahan

Bahan penelitian ini meliputi bunga rosella dari daerah Tawangmangu, gula pasir (sukrosa), serta kultur kombucha yang mengandung campuran bakteri asam laktat, bakteri asam asetat, dan ragi serta *Lactobacillus plantarum* dari lab tech and Microbiology Supplies yang bersertifikat, *Symbiotic Culture Of Bacteria And Yeast* (SCOBY), reagen Wagner, Mayer, Dragendorff, Liberman-Buchard, $FeCl_3$, aquadest, HCl 2%, dan serbuk Mg, *Nutrient agar*, *nutrient broth*, *E. coli* ATCC 25922, *endo agar*, SIM (*Sulfida Indo Motility*), KIA (*Klinger Iron Agar*), BHI (*Brain Heart Agar*), LIA (*Lysine Iron Agar*), *Medium Mueller Hinton Agar* (MHA), *blank disk*, antibiotik kontrol positif Ciprofloxacin, DMSO (pelarut kontrol negatif), Aquadest.

Pembuatan Kombucha Bunga Rosella

Kombucha bunga rosella dengan menimbang bunga rosella kering sebanyak 30, 40, dan 50 gram, lalu dimasukkan ke dalam 1000 ml air dan direbus hingga volumenya berkurang menjadi 500 ml dan menghasilkan warna merah. Larutan disaring menggunakan kasa steril ditambahkan gula sebanyak 10% dari total volume larutan, diaduk hingga merata, dan dibiarkan hingga dingin ditambahkan starter sebanyak 10% dari total volume.

Toples kaca kemudian ditutup rapat dan dibungkus dengan kasa, lalu difermentasi selama 7, 14, dan 21 dalam kondisi gelap. Bunga rosella ditambahkan kultur starter kombucha isolat bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan

Bifidobacterium lactis dengan perbandingan (1:1:1) dalam larutan bunga rosella. Larutan selanjutnya difermentasi dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda-beda yaitu waktu dari hari ke 1,7, 14 dan 21 dengan suhu (4, 25 dan 37°C).

Skrining Fitokimia Kombucha Rosella

1. Uji saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 ml asam klorida (HCl) 2N. Larutan tersebut didinginkan dan dikocok selama 30 detik. Terbentuknya busa yang bertahan lebih dari 30 detik menandakan keberadaan saponin dalam sampel (Sari & Aryantini, 2018).

2. Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan memanaskan sampel hingga kering, diikuti penambahan 2-3 tetes etanol, serbuk magnesium, dan 5 mL HCl. Perubahan warna menjadi merah hingga merah lembayung mengindikasikan adanya flavonoid pada ekstrak (Hanani, 2015).

3. Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara sampel ditambahkan HCL 2N sebanyak 5 ml, kemudian dilakukan uji dengan reagen Mayer, Wagner, dan Dragendorff. Hasil positif alkaloid ditunjukkan adanya endapan putih untuk peraksi Mayer, warna coklat muda untuk pereaksi Wagner dan warna merah jingga untuk pereaksi Dragendorff (Sari & Aryantini, 2018).

4. Uji tanin dan polifenol

Sebanyak 3 mL sampel diambil, lalu diekstraksi menggunakan akuades panas dan didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Selanjutnya, ditambahkan 5 tetes larutan NaCl 10% dan dilakukan penyaringan. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi tiga bagian, yaitu A, B, dan

5. Uji steroid dan terpenoid

Sebanyak 5 tetes ekstrak nonpolar dari sampel ditambahkan masing-masing satu tetes asam sulfat pekat (H_2SO_4) dan asam asetat pekat. Perubahan warna menjadi merah atau ungu menandakan adanya senyawa terpenoid, sedangkan perubahan warna menjadi hijau mengindikasikan keberadaan senyawa steroid (Hamad *et al.*, 2017).

Uji Organoleptik Kombucha Rosella

Uji Organoleptik dilakukan secara visual dengan mengamati bentuk, warna, serta mencium bau dan merasakan rasa dari sampel kombucha rosella (Sari dan Aryantini, 2018).

Pengukuran pH Kombucha Rosella

pH dari larutan kombucha rosella diukur sebanyak 25 mL menggunakan pH meter dan kertas pH (Sari dan Aryantini, 2018).

Uji Total Asam Kombucha Rosella Selama Waktu Fermentasi

Uji total asam dilakukan melalui metode titrasi alkalimetri, dengan langkah awal menstandarisasi larutan NaOH menggunakan asam asetat. Selanjutnya, sebanyak 25 mL sampel diambil dan ditambahkan tiga tetes indikator fenolftalein. Titrasi kemudian dilakukan menggunakan larutan NaOH 0,1 N hingga larutan menunjukkan perubahan warna menjadi merah muda (Aridona *et al.* 2015). Fermentasi dilakukan menggunakan rasio padat-cair

sebesar 30-50 g/L, dengan volume kerja 500 mL pada setiap wadah fermentasi dan ruang headspace sebesar 20-30% dari total kapasitas wadah. Suhu fermentasi dikendalikan menggunakan inkubator pada suhu tertentu sesuai perlakuan, dan seluruh peralatan yang digunakan disterilisasi terlebih dahulu melalui autoklaf atau pemanasan kering.

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi

Uji aktivitas antibakteri *E. coli* dengan metode difusi cakram kertas, siapkan cawan petri steril kemudian media MHA dituang ke dalam petri steril diratakan dan diamkan sampai memadat. Lempeng agar digoreskan suspensi bakteri *E. coli* diatas permukaan media. Suspensi bakteri setara dengan *Mc Farlan* 0,5. Media yang ada kultur *E. coli* diletakkan kertas cakram yang sudah ditetaskan larutan uji (kombucha rosella yang sudah difermentasi dengan variasi konsentrasi dan suhu fermentasi), ciprofloxacin sebagai kontrol positif selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Hasil zona hambat berupa zona jernih disekitar cakram diukur dengan jangka sorong. Pengujian dilakukan pada hari 7, 14 dan 21 pada masing-masing konsentrasi fermentasi kombucha rosella. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah jernih yang terbentuk di sekitar kertas cakram atau *disk blank* yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri *E. coli* (Puspitasari, 2018).

Uji Aktivitas Antibakteri Metode Dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri dengan metode dilusi dilakukan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari kombucha rosella. Media uji yang digunakan adalah *Brain Heart Infusion* (BHI). Rangkaian uji terdiri atas satu deret 10 tabung reaksi steril berisi kombucha rosella hasil fermentasi paling aktif.

Penentuan KHM dilakukan dengan menggunakan kombucha bunga rosella konsentrasi 50% yang diperoleh pada hari ke-21 fermentasi selanjutnya dibuat konsentrasi yang diencerkan secara bertingkat dari 100% sampai 0,78%. Suspensi bakteri ditambahkan secara aseptik ke masing-masing tabung. Semua tabung tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) diperoleh dengan cara menginokulasikan media dari tabung jernih ke media Endo agar, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Selanjutnya, pertumbuhan koloni bakteri pada

permukaan media diamati untuk memastikan keberadaannya.

Analisa Data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan menggunakan aplikasi SPSS Statistics. Tahap awal meliputi uji normalitas dan uji homogenitas. Apabila pada uji normalitas diperoleh nilai > 0.05 dari sig. Atau signifikansi atau probabilitas, maka data dianggap berdistribusi normal. Selanjutnya, uji homogenitas dilakukan untuk menilai kesamaan varians. Jika hasil uji menunjukkan nilai > 0.05 maka dapat disimpulkan bahwa varians data bersifat homogen, yaitu tidak terdapat perbedaan yang signifikan (Nuryadi *et al.*, 2017).

Analisis Atomik Absorption Spectrophotometer (AAS)

ASS digunakan pada penelitian ini untuk menganalisis kebocoran sel pada penelitian ini. Analisis kebocoran ion dilakukan pada tabung yang dinyatakan dengan perhitungan satu kali KBM dan 2 kali KBM serta pada suspensi bakteri *E. coli* tanpa perlakuan. ASS digunakan untuk mendeteksi dari kebocoran ion-ion seperti K^+ dan Ca^{2+} . hasil dari 1 kali KBM dan 2 kali KBM kemudian diambil 1 mL selanjutnya diencerkan dilabu takar 100mL. Hasil diukur dengan destruksi basah menggunakan HNO_3 (Bankaji, 2023).

Kebocoran ion dinyatakan berdasarkan terdeteksinya ion logam pada bakteri uji setelah kontak dengan fraksi aktif pada konsentrasi 0 (kontrol), 1, dan 2 kali KBM. Cairan supernatan dianalisis menggunakan AAS Thermo Elemental tipe Solar MS. Sementara itu, larutan sel yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dengan fraksi aktif diambil untuk dianalisis kandungan ion-ionnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

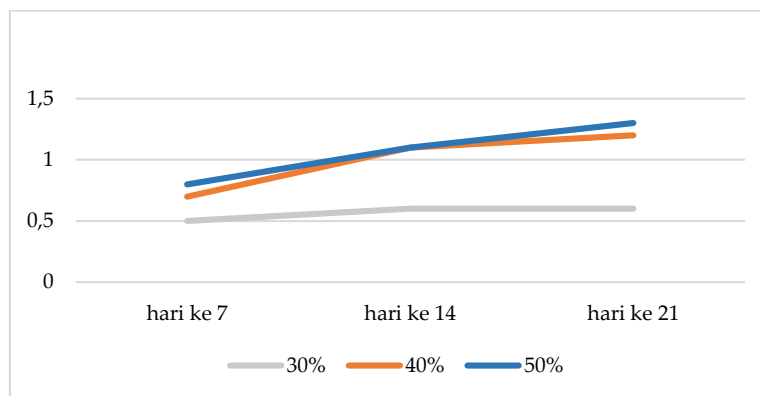
Fermentasi kombucha akan menghasilkan lapisan putih SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) yaitu berupa lapisan putih yang mengapung. Hasil SCOBY diukur menggunakan penggaris untuk melihat ketebalan. Bakteri *Acetobacter xylosum* mampu mengoksidasi glukosa menjadi asam glukonat dan asam organik lain pada waktu yang bersamaan. Selain itu, bakteri ini mensintesis glukosa menjadi polisakarida atau selulosa berbentuk serat putih. Selulosa tersebut secara bertahap membentuk lapisan SCOBY hingga mencapai ketebalan tertentu pada akhir proses fermentasi, yang selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai inokulum untuk fermentasi berikutnya. Hasil ketebalan SCOBY bisa dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Ketebalan SCOBY Kombucha Bunga Rosella

No.	Waktu	Suhu (°C)	Konsentrasi (%)	Ketebalan SCOBY (cm)
1	Hari ke-7	4	30	0,5
		25	40	0,7
		37	50	0,8
2	Hari ke-14	4	30	0,6
		25	40	1,1
		37	50	1,1
3	Hari ke-21	4	30	0,6
		25	40	1,2
		37	50	1,3

Proses biokimia sekunder dari *Acetobacter* mengubah glukosa menjadi asam glukonat, sehingga mikroorganisme dalam teh kombucha memanfaatkan

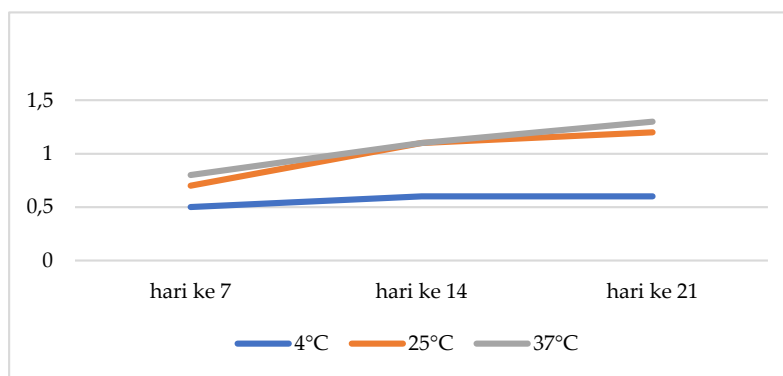
sumber karbon dan membentuk selulosa yang terlihat sebagai lapisan tipis pada permukaan wadah fermentasi (Aditiwati dan Kusnadi, 2013).



Gambar 1. Hubungan konsentrasi dengan ketebalan SCOBY

Hubungan antara konsentrasi kombucha bunga rosella terhadap ketebalan SCOBY (Gambar 1) menunjukkan adanya peningkatan ketebalan SCOBY seiring bertambahnya waktu fermentasi dan konsentrasi rosella yang digunakan. Pada hari ke-7, SCOBY yang terbentuk masih relatif tipis. Ketebalan SCOBY pada konsentrasi 30% hanya mencapai sekitar 0,5 cm, sedangkan pada konsentrasi 50% sudah mulai terbentuk lebih tebal, yaitu sekitar 0,8 cm. Semakin meningkat waktu fermentasi menjadi 14 hari dan 21 hari, ketebalan SCOBY pun meningkat secara signifikan pada semua variasi konsentrasi.

Ketebalan maksimum tercapai pada hari ke-21 dengan konsentrasi 50%, yaitu sebesar 1,3 cm, sementara konsentrasi 30% hanya menghasilkan ketebalan sekitar 0,9 cm. Semakin tinggi konsentrasi larutan bunga rosella, maka semakin banyak senyawa metabolit dan nutrisi yang tersedia bagi mikroorganisme dalam kombucha, seperti ragi (*Saccharomyces*) dan bakteri asam asetat (*Acetobacter*). Nutrient berperan dalam sintesis selulosa yang membentuk matriks SCOBY merupakan parameter untuk keberhasilan dari fermentasi kombucha dan kualitas kombucha (Greenwalt *et al.*, 2000; Jayabalan *et al.*, 2014).



Gambar 2. Hubungan suhu dengan ketebalan SCOBY

Gambar 2 menunjukkan bahwa suhu yang lebih hangat mempercepat aktivitas mikroba dalam pembentukan selulosa oleh bakteri asam asetat dan ragi dalam fermentasi. Memasuki hari ke-14, ketebalan SCOBY meningkat. Pada kombinasi suhu 25°C dan konsentrasi 40%, ketebalan mencapai 1,1 cm, sementara pada suhu 37°C dan konsentrasi 50%, ketebalan meningkat menjadi 1,2 cm. Waktu fermentasi dan semakin tinggi suhu serta konsentrasi bahan, maka aktivitas mikroorganisme semakin optimal dalam membentuk matriks SCOBY. Fermentasi kombucha sangat dipengaruhi oleh suhu fermentasi dan konsentrasi substrat yang digunakan.

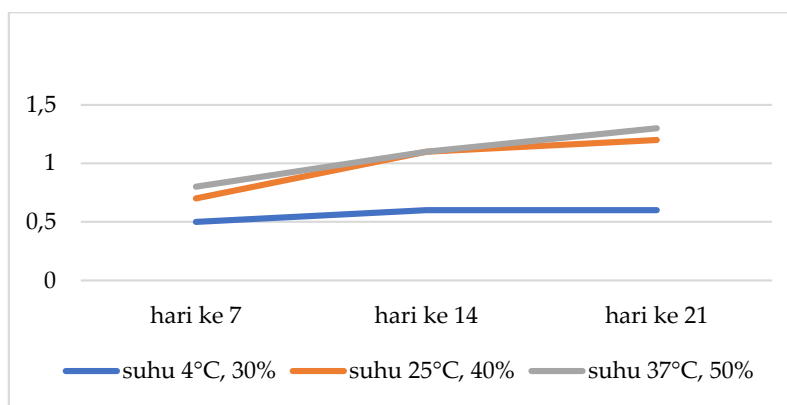
Suhu optimal untuk pertumbuhan SCOBY berada pada kisaran 25-45°C sehingga menghasilkan lapisan selulosa (SCOBY) yang tebal dan stabil. Suhu dibawah 20°C menyebabkan pertumbuhan SCOBY menjadi lambat

dan tipis karena aktivitas mikroorganisme menurun, sementara suhu di atas 45°C dapat mengganggu keseimbangan mikroba karena suhu pertumbuhan optimal untuk bakteri mesofilik berada pada kisaran 20-45°C (Chen *et al.*, 2020). Menurut penelitian Cerdoso *et al.*, 2020 tentang pengaruh suhu yang berbeda dalam fermentasi kombucha teh sehingga akan meningkatkan jumlah mikroorganisme yang relevan dengan nilai total asam yang lebih tinggi.

Waktu fermentasi juga berpengaruh besar terhadap ketebalan SCOBY (Gambar 3). Proses pembentukan lapisan selulosa bersifat akumulatif dan membutuhkan waktu agar bakteri dapat menyintesis selulosa secara optimal. Oleh karena itu, pada hari ke-21, ketebalan SCOBY mencapai titik tertinggi dibandingkan pada hari ke-7 maupun ke-14. Hal ini sejalan dengan temuan Malbasa *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa

pertumbuhan SCOBY terus meningkat hingga hari ke-21, kemudian berada pada fase stabil. Selain itu, kandungan antosianin dan senyawa fenolik dalam bunga rosella juga diyakini berkontribusi terhadap aktivitas mikroba selama fermentasi, karena memberikan lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri dan ragi (Ali *et al.*, 2005). Semakin pekat larutan rosella, semakin besar pula kontribusi senyawa aktif terhadap laju fermentasi dan pembentukan biomassa SCOBY. Hari ke-21, ketebalan SCOBY mencapai nilai tertinggi yaitu 1,3 cm, yang

diperoleh pada suhu 37°C dan konsentrasi 50%. Ini menunjukkan bahwa kondisi suhu hangat (mendekati suhu inkubator) dan konsentrasi substrat tinggi memberikan lingkungan optimal bagi pertumbuhan koloni mikroba penghasil selulosa, seperti *Acetobacter xylinum*, yang membentuk struktur SCOBY. Sebaliknya, pada suhu dingin seperti 4°C, pembentukan SCOBY cenderung terhambat karena aktivitas fermentasi menjadi lambat, terbukti dengan hasil hanya 0,6 cm meskipun fermentasi dilakukan selama 21 hari.



Gambar 3. Hubungan waktu dengan ketebalan SCOBY

Kandungan polifenol dan nutrient lebih tinggi yang mendukung metabolisme mikroorganisme fermentasi. Tebal-tipisnya SCOBY yang terbentuk akan mempengaruhi kandungan senyawanya. Ketebalan SCOBY bisa menjadi indikator bahwa proses fermentasi berjalan optimal dan menghasilkan senyawa bermanfaat dalam jumlah lebih banyak (Jayabalan *et al.*, 2007).

Mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi kombucha yakni bakteri asam asetat (*Acetobacter sp*) dan yeast. Yeast proses diawal fermentasi dengan mengubah gula menjadi alkohol dan senyawa lainnya. Gula dengan mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat dan asam organik oleh bakteri asam asetat (*Acetobacter Sp*) (Kusnadi,

2013). Lapisan kombucha membentuk lapisan yang semakin tebal berkembang dari hari fermentasi sebelumnya bahwa nutrisi dibutuhkan untuk fermentasi alkohol merupakan sebuah larutan gula sederhana, yang umumnya gula tersebut mudah digunakan oleh kelompok khamir yakni glukosa pH fermentasi menentukan aktivitas optimal mikroorganisme yang mampu berperan dalam fermentasi alkohol (Zubaidah, 2022).

Uji organoleptik filtrat dilakukan untuk mengetahui rasa, bau dan warna terhadap kombucha berbasis bunga rosella berdasarkan karakteristik yaitu warna, aroma, rasa, dan tingkat kesukaan keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptik Kombucha

No.	Waktu	Suhu (°C)	Konsentrasi (%)	Warna	Aroma	Rasa
1	Hari ke-7	4	30	Merah tua	Khas rosella	Manis
		25	40	Merah tua	Khas rosella dan berbau sedikit asam kombucha	Manis asam
		37	50	Merah tua	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat
2	Hari ke-14	4	30	Merah tua pekat	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat
		25	40	Merah tua pekat	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat
		37	50	Merah tua pekat	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat
3	Hari ke-21	4	30	Merah tua pekat	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat
		25	40	Merah tua pekat	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat
		37	50	Merah kehitaman pekat	Khas rosella berbau asam kuat kombucha	Asam kuat

Fermentasi dengan suhu dan waktu makin tinggi, menghasilkan kombucha dengan rasa yang cenderung lebih asam dan kuat aromanya, terutama setelah hari ke-14 dan ke-21. Pada awal fermentasi, kombucha rosella memiliki rasa manis, namun seiring berjalannya waktu, rasa asam mulai muncul dan semakin kuat. Peningkatan rasa asam ini disebabkan oleh aktivitas ragi dan bakteri dalam memetabolisme sukrosa menghasilkan berbagai asam organik, seperti asam asetat, asam glukonat,

dan asam glukuronat. Proses ini menyebabkan rasa khas bunga rosella perlahan memudar, digantikan oleh dominasi rasa asam (Wistiana dan Zubaidah, 2015).

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa bioaktif pada filtrat kombucha. Hasil uji kandungan kimia kombucha bunga rosella menggunakan metode reaksi warna. Hasil skrining dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Skrining Fitokimia Kombucha Bunga Rosella

No.	Parameter	Sampel	Hasil menurut Literatur	Hasil	Keterangan
1	Saponin	Filtrat 30%	Terbentuk busa	Busa 1 cm	+
		Filtrat 40%	Terbentuk busa	Busa 1 cm	+
		Filtrat 50%	Terbentuk busa	Busa 1 cm	+
2	Flavonoid	Filtrat 30%	Terbentuk warna merah hingga merah lembayung	Merah lembayung	+
		Filtrat 40%	Terbentuk warna merah hingga merah lembayung	Merah lembayung	+
		Filtrat 50%	Terbentuk warna merah hingga merah lembayung	Merah lembayung	+
3	Alkaloid	Filtrat 30%	Terbentuk warna merah kecoklatan & jingga	Merah kecoklatan & jingga	+
		Filtrat 40%	Terbentuk warna merah kecoklatan & jingga	Merah kecoklatan & jingga	+
		Filtrat 50%	Terbentuk warna merah kecoklatan & jingga	Merah kecoklatan & jingga	+
4	Tanin	Filtrat 30%	Terbentuk endapan putih	Endapan putih	+
		Filtrat 40%	Terbentuk endapan putih	Endapan putih	+
		Filtrat 50%	Terbentuk endapan putih	Endapan putih	+
5	Polifenol	Filtrat 30%	Terbentuk warna hitam kebiruan	Hitam kebiruan	+
		Filtrat 40%	Terbentuk warna hitam kebiruan	Hitam kebiruan	+
		Filtrat 50%	Terbentuk warna hitam kebiruan	Hitam kebiruan	+
6	Terpenoid	Filtrat 30%	Terbentuk warna merah	Warna merah	+
		Filtrat 40%	Terbentuk warna merah	Warna merah	+
		Filtrat 50%	Terbentuk warna merah	Warna merah	+

Berdasarkan data tersebut, kombucha bunga rosella positif mengandung senyawa aktif saponin, flavonoid, alkaloid, tanin, polifenol dan terpenoid. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Purnamasari, (2021) bunga rosella mengandung polifenol, alkaloid, tanin, saponin, steroid, dan flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki kemampuan menghambat

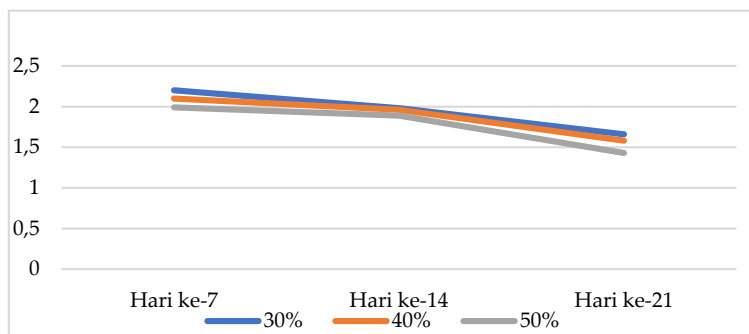
pertumbuhan bakteri patogen, sehingga berpotensi digunakan sebagai terapi komplementer dengan efek antiinflamasi dan antibakteri, sebagaimana ditunjukkan dalam penelitian Rahman *et al.* (2016). Hasil uji pH kombucha bunga rosella dengan berbagai variasi menghasilkan terdapat perbedaan pH yang dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Waktu, Suhu, Konsentrasi Dan Ph Kombucha

No.	Waktu	Suhu (°C)	Konsentrasi (%)	pH
1	Hari ke-7	4	30	2,2
		25	40	2,1
		37	50	1,99
2	Hari ke-14	4	30	1,98
		25	40	1,96
		37	50	1,89
3	Hari ke-21	4	30	1,66
		25	40	1,58
		37	50	1,43

Menurut Jayabalan *et al.* (2007), pH kombucha secara bertahap menurun selama proses fermentasi akibat aktivitas mikroorganisme seperti *Acetobacter* dan ragi, yang mengubah gula menjadi berbagai asam organik, termasuk

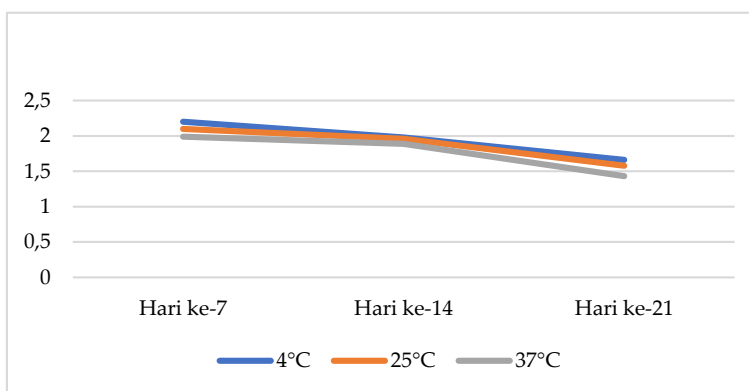
asam asetat, asam glukonat, dan asam laktat. Konsentrasi sampel konsentrasi teh atau bahan aktif seperti bunga rosella dan suhu fermentasi memiliki pengaruh yang signifikan terhadap nilai pH akhir kombucha.



Gambar 4. Konsentrasi dengan pH

Pengujian pH pada konsentrasi fermentasi kombucha bunga rosella bertujuan untuk melihat perubahan tingkat keasaman selama proses fermentasi berlangsung. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa nilai pH mengalami penurunan seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi (Gambar 4). Fermentasi dengan suhu yang lebih tinggi dan konsentrasi bahan yang lebih pekat mempercepat proses pengasaman, karena laju

metabolisme mikroorganisme menjadi lebih tinggi dalam kondisi tersebut. Penurunan pH ini sesuai dengan literatur Jayabalan *et al.* (2007), yang menyatakan bahwa fermentasi kombucha secara alami menyebabkan pH menurun secara bertahap karena akumulasi senyawa asam organik seperti asam glukonat, asam asetat, dan asam laktat. Suhu 37°C dan konsentrasi tinggi 50% memberikan efek pengasaman paling kuat (Gambar 5).



Gambar 5. Suhu Dengan Ph

Gambar 6 menunjukkan bahwa hasil pengukuran pH memperlihatkan penurunan signifikan mulai hari ke-7 hingga hari ke-21, khususnya pada perlakuan dengan konsentrasi 50% dan suhu 25°C. Penurunan nilai pH menunjukkan bahwa fermentasi berjalan dengan aktif, di mana mikroorganisme dalam kultur SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) menghasilkan asam organik seperti asam asetat, asam glukonat, dan asam laktat (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Suhu 37°C menunjukkan penurunan pH paling cepat, diikuti oleh suhu 25°C dan 4°C. Hal ini disebabkan karena suhu yang lebih tinggi dapat meningkatkan aktivitas enzim dan pertumbuhan mikroba, sehingga mempercepat produksi asam organik (Jay, 2000). Semakin tinggi suhu, semakin cepat bakteri asam asetat dan khamir dalam SCOBY melakukan fermentasi. Suhu 4°C menunjukkan penurunan pH yang lambat, karena kondisi dingin menghambat aktivitas mikroorganisme. Mikroba seperti khamir dan bakteri asam asetat tumbuh lambat pada suhu rendah, sehingga produksi asam berlangsung lebih lambat (Chen *et al.*, 2020).

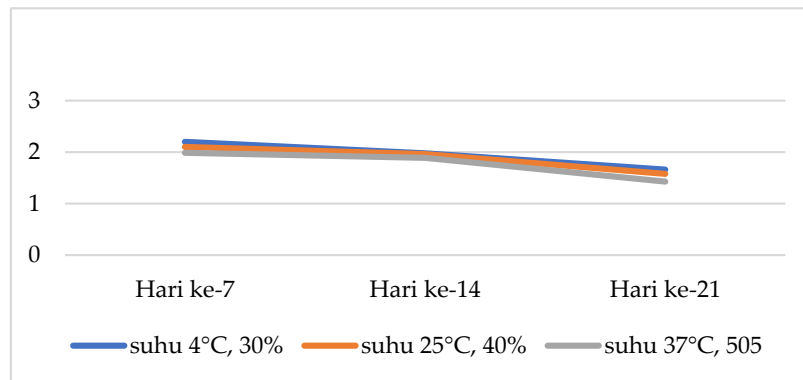
Semua garis menunjukkan tren pH menurun seiring waktu fermentasi meningkat. Semakin lama difermentasi, kombucha menjadi semakin asam pH lebih rendah. Penurunan pH paling besar terjadi pada suhu 37°C dan konsentrasi 50%. Ini menunjukkan bahwa fermentasi pada suhu 37°C lebih mempercepat aktivitas mikroba.

Suhu 4°C menunjukkan penurunan pH yang paling lambat. Karena pada suhu rendah, mikroorganisme seperti *Acetobacter* dan *Saccharomyces* menjadi tidak aktif atau sangat lambat pertumbuhannya. Penelitian oleh Chen *et al.* (2020) menunjukkan bahwa pada fermentasi 7-10 hari pH kombucha turun dari sekitar 5,0 menjadi 2,7 pada suhu ruang 25-28°C. Hal ini juga sejalan dengan studi oleh Malbasa *et al.* (2008), yang menyatakan bahwa peningkatan konsentrasi dan gula mempercepat penurunan pH, tetapi tetap harus dikontrol agar tidak terlalu asam dan mengganggu cita rasa atau keamanan konsumsi.

Senyawa bioaktif yang terkandung dalam rosella dan zat yang terbentuk selama fermentasi kombucha berperan sebagai antibakteri. Pengujian aktivitas

antibakteri kombucha bunga rosella pada bakteri *Escherichia coli* dengan variasi konsentrasi 30, 40, dan 50%, serta pada kondisi suhu 4, 25, dan 37°C dengan lama inkubasi masing-masing 7, 14, dan 21 hari dengan metode

difusi menghasilkan diameter daya hambat yang berbeda-beda. Hasil uji aktivitas antibakteri disajikan dengan data lengkap dapat dilihat pada Tabel 5.



Gambar 6. Waktu dengan pH

Kombucha yang difermentasi selama 21 hari pada suhu 37°C dengan konsentrasi 50% memiliki perbedaan signifikan dibanding kelompok lain dalam menghambat *E. coli* ($p < 0.05$). Kombucha rosella menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* yang meningkat dengan meningkatnya konsentrasi, suhu fermentasi yang optimal (37°C), Lama fermentasi (hingga 21 hari) zona hambat $16,7 \pm 0,10$ mm masuk kategori kuat. Hasil uji aktivitas kombucha rosella masih belum sebaik efek antibiotik ciprofloxacin.

Aktivitas antibakteri, yang diduga karena senyawa aktif hasil metabolisme mikroba selama fermentasi berlangsung. Pada kondisi tersebut, terjadi peningkatan produksi asam organik seperti asam asetat dan asam laktat, hidrolisis flavonoid, serta peningkatan komponen fenolik bebas yang bekerja secara sinergis untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* (Villarreal-Soto *et al.*, 2018). Aktivitas ini diduga berasal dari kombinasi senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, antosianin, asam organik (asam asetat, asam glukonat, asam laktat), serta senyawa fenolik hasil fermentasi yang telah terbukti memiliki sifat antimikroba (Zhao *et al.*, 2020; Penelitian UCPH, 2022).

Kandungan asam asetat dan aktivitas metabolit sekunder dalam sampel uji menyebabkan pembentukan zona bening atau zona hambat. Flavonoid memiliki peran sebagai antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat, sehingga mengganggu membran sitoplasma serta metabolisme bakteri. Selain itu, saponin bekerja dengan menurunkan tegangan permukaan sel bakteri, yang meningkatkan permeabilitas membran atau menyebabkan kebocoran sel, sehingga senyawa intraseluler keluar. Tanin dapat menghambat aktivitas enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase, sehingga mengganggu proses pembentukan sel bakteri. Selain itu, katekin memiliki kemampuan untuk merusak membran lipid bilayer, sehingga mengakibatkan disrupsi struktur serta fungsi sel yang pada akhirnya berujung pada kematian sel (Arifianti, 2015).

Selain senyawa antibakteri yang terkandung dalam rosella, zat yang terbentuk selama fermentasi kombucha seperti asam asetat juga berperan sebagai

antibakteri. Mekanisme penghambatan ini terjadi melalui proses denaturasi protein yang berakibat pada terhentinya metabolisme sel bakteri, sehingga pertumbuhan baik bakteri Gram positif maupun Gram negatif dapat terhambat (Chofidah *et al.*, 2019).

Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi menentukan nilai Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Kombucha yang difermentasi selama 21 hari pada suhu 37°C dengan konsentrasi 50% diuji aktivitas dengan metode dilusi, hasil dapat dilihat pada Tabel 6.

Metode dilusi memiliki peran penting dalam penentuan dosis minimal obat yang memiliki efek *bakteriostatik* maupun *bakterisid*. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) diperoleh dari konsentrasi terendah di mana tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri pada media. Hasil KBM kombucha bunga rosella pada konsentrasi 25%. Tadesse *et al.* (2021) menyatakan bahwa fermentasi rosella selama 21 hari menghasilkan aktivitas antioksidan dan antibakteri tertinggi. Santoso & Lestari (2022) menunjukkan bahwa pada hari ke-21, kandungan flavonoid dan asam total mencapai puncak. pH rendah sebagai penanda keaktifan fermentasi, Pada konsentrasi 50% dan fermentasi 21 hari di suhu 37°C, pH cenderung turun drastis, bahkan bisa mencapai pH 2,6–2,8.

Penurunan ini menunjukkan terbentuknya asam-asam seperti: Asam laktat, Asam asetat, Asam sitrat, Asam fenolik, manfaat pH rendah terhadap *E. coli* $pH < 3$ dapat merusak integritas membran bakteri gram negatif seperti *E. coli*, membuat mereka lebih rentan terhadap kerusakan sel Yuliani (2021) mencatat bahwa fermentasi rosella selama 21 hari menurunkan pH menjadi < 3 , seiring peningkatan total asam dan daya hambat terhadap *E. coli*. Oyetayo (2019) menyatakan bahwa $pH < 4$ sangat efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri enterik. KBM (*MBC-Minimum Bactericidal Concentration*).

Pengujian kebocoran ion dilakukan dengan tujuan mendeteksi keberadaan ion logam K^+ dan Ca^{2+} yang dilepaskan dari sel bakteri. Hasil uji kebocoran ion bakteri *E. coli* dilakukan pada suspensi *E. coli* tanpa perlakuan, 1 KBM (25 %) dan 2KBM (50%). Keberadaan ion K^+ dan Ca^{2+} yang terbaca pada alat AAS. Terbacanya ion K^+ dan Ca^{2+}

menunjukkan bahwa sel bakteri mengalami kebocoran atau kerusakan (Dwiningsih *et al.*, 2016).

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Difusi Cakram

No.	Waktu	Suhu (°C)	Konsentrasi (%)	Diameter hambat (mm)			Rata-rata ± SD		
				Replikasi					
				1	2	3			
1	hari-7	4	30	8,20	8,00	8,30	8,16±0,15		
			40	10,00	10,3	10,5	10,2±0,25		
			50	11,3	11,5	11,0	11,2±0,25		
		25	30	8,50	8,30	8,00	8,26±0,25		
			40	10,5	10,2	10,3	10,3±0,15		
			50	11,0	11,2	11,3	11,1±0,15		
		37	30	8,40	8,30	8,50	8,4±0,10		
			40	10,5	10,4	10,5	10,5±0,10		
			50	11,1	11,5	11,2	11,2±2,70		
		2	hari-14	4	30	9,70	9,50	9,20	9,46±0,25
					40	10,6	10,1	10,3	10,3±0,25
					50	11,3	11,5	11,6	11,4±0,15
25	30			10,5	10,3	10,2	10,3±0,15		
	40			11,3	11,5	11,8	11,5±0,25		
	50			12,5	12,4	12,4	12,3±0,15		
37	30			9,30	9,60	9,10	9,33±0,25		
	40			10,5	10,9	10,2	10,5±0,35		
	50			11,4	11,3	11,5	11,4±0,10		
3	hari-21			4	30	10,3	10,4	10,2	10,3±0,10
					40	11,2	11,5	11,3	11,3±0,15
					50	12,5	12,3	12,4	12,4±0,10
		25	30	11,2	11,4	11,4	11,3±0,11		
			40	13,3	13,5	13,3	13,3±13,3		
			50	15,0	15,3	15,5	15,5±15,2		
		37	30	15,0	15,3	15,5	15,2±0,25		
			40	15,5	15,4	15,6	15,5±0,10		
			50	16,6	16,8	16,7	16,7±0,10		
		4	Kontrol positif (Ciprofloxacin)		32,8	32,5	33,3	32,8±0,40	
		5	Kontrol negatif (Aquaset steril)		0,00	0,00	0,00	0,00	

Tabel 6. Tabel Uji Aktivitas Antibakteri Metode Dilusi Kombucha Rosella

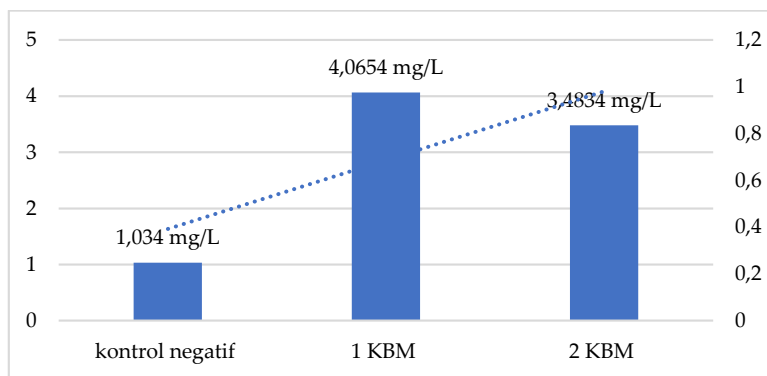
No.	Konsentrasi (%)	Hasil		
		I	II	III
1	Kontrol -	-	-	-
2	100	-	-	-
3	50	-	-	-
4	25	-	-	-
5	12,5	+	+	+
6	6,25	+	+	+
7	3,125	+	+	+
8	1,56	+	+	+
9	0,78	+	+	+
10	Kontrol +	+	+	+

Keterangan: (+) = adanya pertumbuhan bakteri, (-) = tidak ada pertumbuhan bakteri

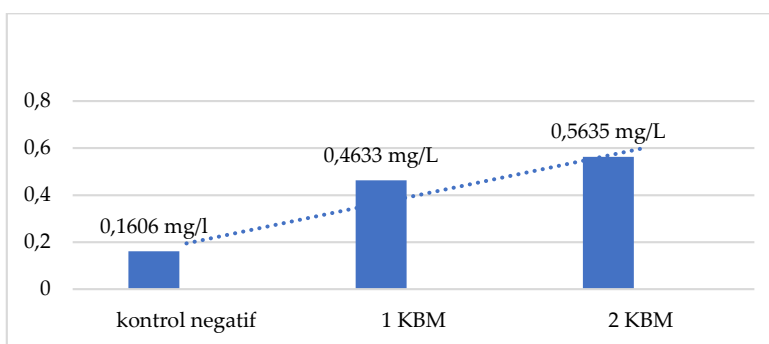
[Gambar 7](#) menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kebocoran ion logam Ca²⁺ seiring meningkatnya konsentrasi perlakuan, baik pada 25% maupun 50% dibandingkan kontrol. Tingginya kebocoran ini menandakan kerusakan membran sel bakteri akibat perlakuan kombinasi senyawa aktif dari fermentasi kombucha rosella. Ion Ca²⁺ merupakan ion penting dalam

menjaga stabilitas dinding sel bakteri, sehingga kebocorannya merupakan indikator efektif dari aktivitas antibakteri. Hal ini memperkuat bukti bahwa fermentasi kombucha rosella dapat mempercepat lisis sel bakteri melalui mekanisme disrupti membran dan demineralisasi ion penting seluler. Ion Ca²⁺ berfungsi menghubungkan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri gram negatif,

sehingga keluarnya ion ini dapat mengganggu stabilitas dinding sel dan menyebabkan kematian bakteri. (Alexander, 2018).



Gambar 7. Kebocoran Ion Logam Ca²⁺



Gambar 8. Kebocoran Ion Logam K⁺

Gambar 8 menunjukkan hasil pengujian terhadap kebocoran ion logam kalium (K⁺) pada sel bakteri setelah diberikan perlakuan berupa kombucha berbasis bunga rosella dengan konsentrasi 25% dan 50%, dibandingkan dengan kontrol. Ion kalium merupakan komponen utama pada intraseluler yang berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan osmotik, aktivitas enzimatik, dan stabilitas membran sel (Silhavy *et al.*, 2010).

Kombucha rosella sudah mulai mengganggu struktur membran sel bakteri, menyebabkan ion K⁺ bocor keluar dari dalam sel. Flavonoid dan tanin dari tanaman seperti rosella dapat menginterkalasi ke dalam membran lipid, sehingga membuatnya lebih permeabel terhadap ion dan molekul kecil (Cushnie & Lamb, 2005). Ion K⁺ yang bocor merupakan indikator biologis yang sensitif terhadap gangguan integritas membran sel (Zhou *et al.*, 2014). Asam asetat dan asam organik lainnya (membuat pH turun drastis), Flavonoid dan tanin (menghambat sintesis protein dan melemahkan dinding sel), Antosianin (mengganggu membran dan menurunkan aktivitas enzim metabolisme bakteri) (Jayabalan *et al.*, 2014).

Hasil penelitian menunjukkan adanya korelasi kuat antara penurunan pH, peningkatan total asam, dan kebocoran ion K⁺ Ca²⁺ dengan aktivitas antibakteri kombucha rosella terhadap *Escherichia coli*. Penurunan pH selama fermentasi disebabkan oleh akumulasi asam organik seperti asam asetat, laktat yang dihasilkan oleh mikroorganisme fermentatif (bakteri asam asetat dan khamir). Asam organik dalam bentuk tidak terionisasi

dapat berdifusi melewati membran luar dan membran sitoplasmik *E. coli*, setelah masuk ke dalam sel dan terdisosiasi, ion K⁺ akan terakumulasi di sitoplasma, menyebabkan penurunan pH intraseluler dan gangguan homeostasis sel (Sreeramulu *et al.* dalam Maranatha).

Akumulasi proton tersebut sangat berpengaruh terhadap integritas membran sel karena membran harus mempertahankan gradien elektrokimia (“proton motive force”). Ketika tekanan proton meningkat struktur bilayer lipid dan protein membran dapat terganggu ini meningkatkan permeabilitas membran dan menurunkan selektivitas ionik (proton dan anion dapat bergerak lebih bebas), sehingga menyebabkan kerusakan membran. Studi lain dengan asam organik menunjukkan bahwa asam-asam ini, terutama dalam bentuk tidak terionisasi, dapat melemahkan interaksi komponen LPS (lipopolisakarida) di membran luar dan menyebabkan kebocoran konten sel seperti protein, asam nukleat, dan ion (K⁺), yang menandakan bahwa membran telah kehilangan integritasnya.

Kebocoran ion, khususnya K⁺, merupakan indikator penting dari disfungsi membran karena sel biasanya sangat menjaga konsentrasi ion intraseluler. Ketika membran menjadi lebih permeabel akibat gangguan struktural, ion-ion ini bocor keluar, keluarnya K⁺ menunjukkan bahwa membran sitoplasmik tidak lagi mampu mempertahankan gradien ioniknya.

Perubahan permeabilitas tersebut juga dapat memicu hilangnya energi (penurunan potensi membran)

dan stress osmotik, yang akhirnya dapat menyebabkan lisis atau kematian sel. Meski demikian, terdapat beberapa keterbatasan dalam penelitian ini ketiadaan data kuantitatif menyebabkan interpretasi efek antibakteri hanya didasarkan pada parameter proses (konsentrasi rosella, suhu, waktu fermentasi), tanpa dapat secara langsung mengubah aktivitas biologi dengan kandungan zat aktif spesifik yang terbentuk selama fermentasi.

Mekanisme aksi atau menentukan parameter Pertama, penelitian belum melakukan kuantifikasi spesifik komponen kimia seperti jenis dan kadar asam organik asetat, laktat maupun senyawa polifenol secara kuantitatif (mg/mL). untuk menyimpulkan kontribusi relatif antara "asam organik" dan senyawa fenolik terhadap mekanisme antibakteri. Polifenol sendiri dapat berkontribusi melalui mekanisme berbeda seperti denaturasi protein membran atau gangguan enzim transport membran, sehingga pemetaan kuantitatif akan sangat memperkuat penafsiran mekanisme.

Kedua, konsentrasi uji antibakteri pada penelitian ini menggunakan pendekatan berbasis persen matriks fermentasi (% v/v) alih-alih menggunakan konsentrasi aktif (mg/mL dari senyawa asam organik utama). Hal ini membatasi kemampuan membandingkan potensi antibakteri dengan hasil penelitian lain dan dengan data standar karena tidak jelas berapa banyak senyawa aktif (asam organik/polifenol) yang bertanggung jawab atas efek.

Ketiga, jika perlakuan suhu rendah (4°C) digunakan sebagai kondisi "perlakuan fermentasi", perlu dikritisi, karena pada suhu ini aktivitas mikroba fermentatif sangat berkurang atau bahkan berhenti. Akumulasi asam dan senyawa bioaktif kemungkinan sangat rendah, sehingga efek antibakteri yang diamati pada kondisi ini lebih mungkin berasal dari stabilitas senyawa yang sudah terbentuk daripada produksi metabolit baru. Hal ini berarti interpretasi efek suhu harus dilakukan dengan hati-hati-suhu 4°C lebih cocok dianggap sebagai kondisi penyimpanan, bukan fermentasi aktif.

Secara keseluruhan, mekanisme utama antibakteri kombucha rosella terhadap *E. coli* dapat dijelaskan dengan gangguan membran yang diinduksi oleh asam organik ditandai oleh penurunan pH, peningkatan total asam, dan kebocoran ion. untuk memperkuat pemahaman mekanistik, penelitian lanjut harus mencakup analisis kimia kuantitatif metabolit aktif dan uji konsentrasi senyawa aktif. Pendekatan tersebut akan meningkatkan pemahaman tentang senyawa mana (asam organik atau fenolik) yang paling berkontribusi terhadap efek antibakteri, serta memungkinkan optimasi formulasi kombucha yang paling efektif.

KESIMPULAN

Fermentasi kombucha berbasis bunga rosella dengan variasi konsentrasi, suhu, dan waktu menunjukkan perbedaan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*. Hasil aktivitas antibakteri tertinggi pada konsentrasi 50%, suhu 37°C, dan waktu fermentasi 21 hari ditunjukkan dengan zona hambat sebesar $16,7 \pm 0,10$ mm. Mekanisme kerja antibakteri pada membran sel *E. coli* melalui kebocoran ion Ca^{2+} dan K^{+} keluar sel.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhamid, A. G., Esaam, A., & Hazaa, M. M. (2018). Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(5), 603–607. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.03.004>
- Ali, B. H., Wabel, N. A., & Blunden, G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A Review. *Phytother*, 19(5), 369–375.
- Chen, C., Liu, B. Y., & Liu, Y. X. (2020). *The microbiota and bioactivity of kombucha: A review*. *Food Bioscience* (Vol. 38). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100782>
- Chofidah, A. I., Danu, M. D., & Rosyidah, I. H. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Kombucha Rosela (Hibiscus sabdariffa L .) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmaceutical-Care Anwar Medika*, 2(1), 43–47.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343–356.
- Dwiningsih, Nopiyanti, V., Rahmawati, I., Wibowo, M. S., & Tjahjono, D. H. (2016). Uji Mekanisme Kerja Antibakteri Senyawa 1,5-difuril-1,4-pentadien-3-on ANALOG Kurkumin terhadap Beberapa Bakteri. *Biomedika*, 9(1), 32–36.
- Estri, M. R., & Anggarbeni, S. R. (2015). Uji Daya Hambat Air Rebusan Bunga Rosella (Hibiscus sabdariffa L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Wiyata*, 2(1), 9–13.
- Fiana, F. M., Zukhruf, N., Kiromah, W., & Purwanti, E. (2020). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 10–20.
- 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), 976–981.
- Hamad, A. S., Jumintera, E., Puspawingtyas, & Hartant, D. (2017). Aktivitas Antibakteri Infusa Kemangi (*Ocimum Basilicum* L.) Pada Tahu Dan Daging Ayam Segar. *Inovasi Teknik Kimia*, 2(1), 1–8.
- Hanani, E. (2015). *Analisis Fitokimia*. EGC.
- Higginbotham, K. L., Burris, K. P., Zivanovic, S., & Davidson, P. M. (2014). Antimicrobial Activity of Hibiscus sabdariffa Aqueous Extracts against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a Microbiological Medium and Milk of Various Fat Concentrations. *Journal of Food Protection*, 77(2), 262–268. <https://doi.org/10.4315/0362-028X>.
- 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, 538–550. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541->

4337.12073

- Jayabalan, R., Marimuthu, S., & Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry*, 102(1), 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.032>
- Jung, E. K., Kim, Y. J., & Joo, N. (2013). Physicochemical Properties And Antimicrobial Activity Of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.). *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*, 93(15), 3769–3776.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia (II)*. Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan.
- Oyetayo, V. O. (2019). Fermentation enhances the antibacterial property of roselle. *Food Research International*, 116, 408–413.
- Santoso, D., & Lestari, Y. (2022). Profile of flavonoid and antibacterial activity of roselle kombucha. *Jurnal Teknologi dan Industri*.
- Süle, E., Al, E., & Süle, E. (2014). Influence of temperature on fermentation rate and product yield. *Food Research International*, 57, 230–239.
- Tadesse, S. A., et al. (2021). Effect of fermentation on phytochemical composition and antibacterial activity of roselle. *Journal of Applied Microbiology*, 130(2), 356–364.
- Teerarak, M., Laosinwattana, C., Tangwatcharin, P., & Pilasombut, K. (2017). Antioxidant and Antibacterial Activities against Food Pathogenic and Spoilage Bacteria by Hibicus Sabdariffa L. (Roselle) Extract. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(3), 379–391.
- 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), 580–588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068>
- WHO. (2020). *Antimicrobial resistance: Global report*. World Health Organization.
- Yuliani, A. (2021). Fermented roselle extract for antibacterial potential. *Indonesian Journal of Applied Biology*, 9(1), 25–31.