

KADAR TOTAL ASAM DAN POTENSI PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Escherichia coli* DAN *Salmonella typhi* OLEH ISOLAT BAKTERI ASAM LAKTAT DARI KOMBUCHA DAUN SIRSAK (*Annona muricata* Linn.)

Aisyah Nurul Aini, Yoni Rina Bintari, Dini Sri Damayanti*

*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRAK

Pendahuluan: Kombucha adalah minuman yang difermentasi oleh *Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeast* (SCOBY) dan memiliki Bakteri Asam Laktat (BAL) yang bersifat probiotik. Daun sirsak adalah herbal yang dapat menjadi bahan dasar pembuatan kombucha dan diduga memiliki efek sebagai antibakteri. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kadar total asam dan aktivitas antibakteri isolat BAL kombucha daun sirsak terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*.

Metode: Daun sirsak yang difermentasi selama 7 hari dan diencerkan menjadi tiga konsentrasi (100%, 50%, dan 25%) serta diukur kadar total asam dan aktivitas antibakteri melalui penelitian *in vitro*. Kadar total asam diukur dengan metode titrasi dan daya hambat terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dinilai menggunakan metode Kirby-Bauer. Hasil analisa *One Way Anova* dengan $p < 0,05$ dianggap signifikan.

Hasil: Kadar total asam dari konsentrasi 100%, 50% dan 25% adalah $0,16 \pm 0,02\%$, $0,07 \pm 0,02\%$, dan $0,03 \pm 0,01\%$ ($p=0,000$). Aktivitas antibakteri dari kombucha daun sirsak terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan dibandingkan kombucha daun teh dan infusa daun sirsak.

Kesimpulan: Kombucha daun sirsak memiliki kadar total asam yang lebih rendah dibandingkan kombucha daun teh, namun tidak memiliki perbedaan daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*.

Kata Kunci : Daun sirsak, kombucha, probiotik, total asam, BAL

*Korespondensi :

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M. Kes

Alamat : Jl. MT Hayono 193, Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

e-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

ABSTRACT

Introduction: Kombucha is a beverage fermented by the Symbiotic Consortium of Bacteria and Yeast (SCOBY) and contains Lactic Acid Bacteria (LAB) which is classified as a probiotic. Soursop leaf is an herb that can be used as a basic ingredient for making kombucha and is thought to have an antibacterial effect. This study was conducted to determine the total acidity and the antibacterial activity of LAB isolated from soursop leaf kombucha against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*.

Methods: Soursop leaf kombucha were fermented for 7 days were diluted into three concentration (100%, 50%, 25%) then the total acidity and antibacterial activity were measured through an *in vitro* study. Total acidity were measured using the titration method and the antibacterial activity on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* was assessed using the Kirby-Bauer method. The results were analyzed by One Way Anova and $p < 0.05$ was considered significant.

Results: The total acidity of concentrations of 100%, 50% and 25% were $0.16 \pm 0.02\%$, $0.07 \pm 0.02\%$, and $0.03 \pm 0.01\%$ ($p=0.000$). The antibacterial activity of soursop leaf kombucha against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* did not show a significant difference compared to tea leaf kombucha and soursop leaf infusion.

Conclusion: Soursop leaf kombucha has lower total acid content than tea leaf kombucha, but there is no difference in antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*.

Keywords: Soursop leaf, kombucha, probiotics, total acidity, LAB

*Corresponding author:

Dr. dr. Dini Sri Damayanti, M. Kes

Address : Jl. MT Haryono 193, Malang City, East Java, Indonesia, 65145

e-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Bakteri *Escherichia coli* termasuk flora normal di dalam saluran pencernaan manusia. Namun, salah satu strain *Escherichia coli* yaitu ETEC (*Enterotoxin Escherichia coli*) dapat menyebabkan infeksi diare dan kematian (700.000) anak-anak <5 tahun setiap tahunnya di seluruh dunia. Di Indonesia kasus infeksi *Escherichia coli* mencapai 411 dari 1000 populasi penduduk setiap tahun^{1,2}.

Selain itu, infeksi *Salmonella typhi* di Indonesia termasuk dalam salah satu kejadian infeksi tertinggi setelah Cina dan India dengan jumlah kasus 350-810 orang per 100.000 populasi setiap tahun³. Infeksi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dapat terjadi melalui konsumsi produk makanan dan minuman yang telah terkontaminasi atau dapat terjadi antar individu dengan higienitas yang buruk⁴.

Pada umumnya, flora normal pada saluran cerna dapat mencegah kolonisasi bakteri patogen melalui produksi peptida antimikroba⁵. Namun, kemampuan pertahanan ini dapat menurun apabila terjadi peningkatan populasi bakteri oportunistik atau bakteri patogen dan menurunnya molekul imunomodulator yang diproduksi oleh flora normal tersebut sehingga menimbulkan infeksi⁶.

Penurunan komposisi flora normal dalam intestinal dapat dicegah dengan produk makanan atau minuman yang mengandung probiotik⁷. Kombucha merupakan salah satu produk minuman fermentasi yang mengandung probiotik, etanol, karbon dioksida, asam organik, metabolit, dan memiliki cita rasa serta aroma yang khas^{8,9}. Bakteri dan yeast pada kombucha berfungsi memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa selama fermentasi. Proses pemecahan ini menyebabkan terjadinya penurunan glukosa dan peningkatan asam¹⁰.

Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kombucha adalah daun sirsak (*Annona muricata* Linn.). Daun sirsak mengandung berbagai macam senyawa aktif seperti asetogenin, saponin, flavonoid, dan tanin¹¹. Selain itu, kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin dapat berperan sebagai antibakteri¹². Selama proses fermentasi terjadi peningkatan total fenol dan flavonoid akibat proses degradasi polifenol oleh mikroba serta terjadi metabolisme tanin menjadi kelompok derivat yang lebih kecil sehingga dapat mengurangi rasa pahit dari daun sirsak¹³.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui total asam dan aktivitas antibakteri isolat BAL kombucha daun *Annona muricata* Linn. pada bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* melalui metode pengukuran zona hambat. Kemampuan dari kombucha daun sirsak akan dibandingkan dengan kontrol kombucha daun teh (*Camellia sinensis*) yang umum digunakan sebagai bahan dasar pembuatan kombucha¹⁴ dan infusa daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) sebagai kontrol tanpa penambahan SCOBY secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian *in vitro* dilakukan pada bulan Mei-Juli 2021 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang (FK UMM).

Sampel Penelitian

Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* non-patogenik diperoleh dari LPRK FK UNISMA. Simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) telah melalui proses determinasi di UPT Laboratorium Herbal Materia Medika Batu.

Pembuatan Kombucha Daun Sirsak

Sebanyak 3 g simplisia daun sirsak yang telah dimasukkan ke dalam kantung teh ditambahkan 500 mL air dan 50 g gula pasir kemudian direbus pada suhu 100°C hingga mendidih lalu diaduk selama 5 menit. Rebusan daun sirsak didinginkan pada toples kaca hingga mencapai suhu ruangan (25-30°C), kemudian ditambahkan 12 g starter SCOBY. Toples kaca selanjutnya ditutup menggunakan tisu kertas dan diikat dengan karet. Rebusan difermentasi selama 7 hari dengan suhu ruang dan tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung¹⁴. Setelah itu, kombucha diencerkan dengan cara mengambil 20 ml kombucha untuk konsentrasi 100% (KDS100%), selanjutnya diambil 10 ml dari KDS 100% lalu ditambahkan 10 ml aquades untuk konsentrasi 50% (KDS50%), dan 10 ml dari KDS 50% ditambahkan 10 ml aquades untuk konsentrasi 25% (KDS25%).

Pengukuran Total Asam Kombucha dengan Titrasi

10 mL tiap konsentrasi kombucha daun sirsak diencerkan menggunakan 50 mL air lalu ditambahkan 5 tetes indikator fenofalein. Setelah itu, larutan dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga menghasilkan warna merah muda. Kadar total asam diukur sebanyak 3 kali pengulangan dengan formula berikut dan hasil didapatkan dalam bentuk persen¹⁵.

$$\% \text{ asam} = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times \text{Eq. wt (0,09)}}{V \text{ sampel} \times 1000} \times 100\%$$

Uji Aktivitas Antibakteri Isolat BAL Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Satu ose kombucha daun sirsak yang telah ditumbuhkan di MRSA (*deMann Rogosa Sharpe Agar*) kemudian diinokulasikan dalam 10 ml MRSB (*deMann Rogosa Sharpe Broth*) dan diinkubasi selama 24 jam untuk menghasilkan starter. 10 ml starter diinokulasi dalam 90 ml MRSB, lalu diinkubasi selama 24 jam. 50 ml kultur disentrifugasi selama 15 menit pada 10.000 rpm dan suhu 4°C¹⁶. Setelah direndam selama 15 menit, cakram diletakkan diatas media dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian diukur zona hambat sebanyak 3 kali pengulangan¹⁶.

Analisis Data

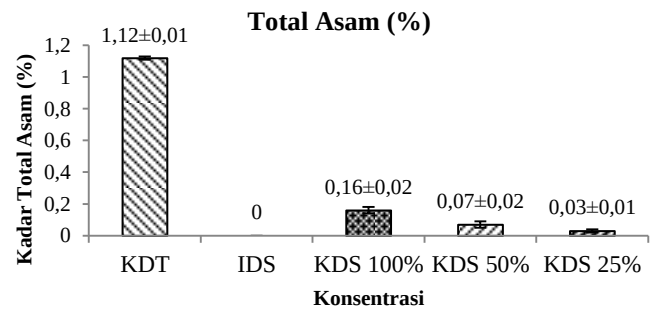
Hasil yang didapatkan berupa kadar total asam (%) dan diameter zona hambat (mm) dari tiap konsentrasi sampel. Data diuji distribusi dan homogenitasnya setelah itu dilakukan uji parametrik *one way* ANOVA. Setelah itu dilakukan uji *post-hoc* dengan menggunakan aplikasi SPSS.

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Total Asam

Rata-rata pengukuran kadar total asam kombucha dapat dilihat melalui **Gambar 1**, yang menunjukkan kadar total asam kelompok kombucha daun sirsak lebih rendah secara signifikan dibandingkan dengan

kombucha daun teh dengan konsentrasi 100% sedangkan infusa daun sirsak tidak mengandung asam.



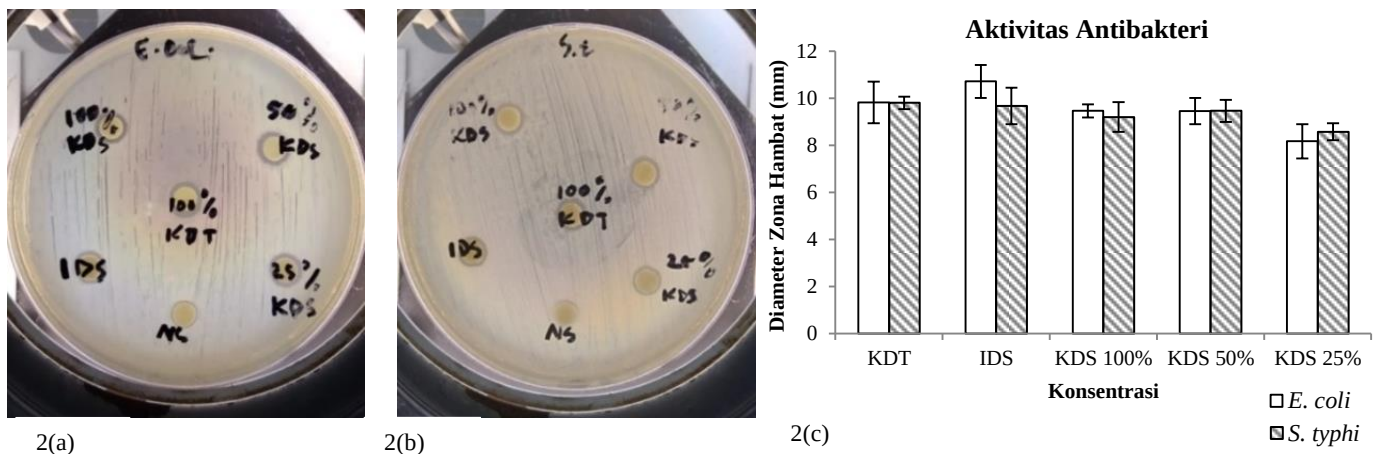
Gambar 1. Rata-rata Total Asam Kombucha Daun Sirsak, Kombucha Daun Teh, dan Infusa Daun Sirsak

Keterangan: IDS= Infusa Daun Sirsak, KDT= Kombucha Daun Teh, KDS 100%= Kombucha Daun Sirsak konsentrasi 100%, KDS 50%= Kombucha Daun Sirsak konsentrasi 50%, dan KDS 25%= Kombucha Daun Sirsak konsentrasi 25%.

Uji Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat (BAL) Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*

Hasil dan diameter rata-rata uji ZOI isolat BAL kombucha daun sirsak pada bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dapat dilihat melalui **Gambar 2a** dan **2b** terlihat 6 cakram dengan 3 diantaranya telah diberikan ekstrak antibakteri dari isolat BAL kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dengan konsentrasi yang berbeda. Dari 6 cakram yang diletakkan diatas media, 5 diantaranya menghasilkan zona bening yang dapat diartikan bahwa terdapat aktivitas antibakteri pada zona tersebut..

Gambar 2c menunjukkan diameter zona hambat oleh isolat BAL dari kombucha daun sirsak pada *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* tidak berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kombucha daun teh dan infusa daun sirsak.



Gambar 2. Hasil Uji ZOI Infusa Daun Sirsak, Isolat BAL Kombucha Daun Teh dan Daun Sirsak pada Bakteri *Escherichia coli* (a), *Salmonella typhi* (b) dan Diameter Rata-Rata yang Dihasilkan (c)

Keterangan: IDS= Infusa Daun Sirsak, KDT= Kombucha Daun Teh, KDS 100%= Kombucha Daun Sirsak konsentrasi 100%, KDS 50%= Kombucha Daun Sirsak konsentrasi 50%, dan KDS 25%= Kombucha Daun Sirsak konsentrasi 25%. Data yang terdistribusi dengan normal dan homogen dilakukan uji One Way ANOVA dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

PEMBAHASAN

Kadar Total Asam pada Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Hasil pengukuran kadar total asam menunjukkan kombucha daun teh memiliki total asam tertinggi lalu diikuti dengan kombucha daun sirsak 100%, sedangkan infusa daun sirsak tidak mengandung asam. Hal ini disebabkan karena infusa daun sirsak tidak memiliki kandungan *yeast* dan mikroba yang dapat menghasilkan asam, sedangkan kombucha memiliki beberapa komponen dari SCOBY yang akan melakukan proses metabolisme anaerob selama proses fermentasi. *Yeast* akan mengeluarkan enzim invertase yang akan membantu proses hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa¹⁷. Setelah itu, *yeast* akan mengubah glukosa menjadi karbondioksida dan etanol. Etanol kemudian dimetabolisme oleh bakteri asam asetat dan asam laktat membentuk berbagai macam asam organik yang akan mempengaruhi kadar total asam¹⁸. Asam organik penting yang terbentuk selama fermentasi diantaranya adalah asam glukonat, asam glukonat, asam laktat, asam piruvat¹⁸ dan asam asetat⁸.

Perbedaan kadar total asam antara kombucha daun teh dan kombucha daun sirsak dapat disebabkan oleh proses persiapan daun teh yang akan digunakan dalam pembuatan kombucha. Setelah dipetik, daun teh akan segera dikeringkan, digulung, dan dipanaskan secara singkat untuk mencegah degradasi komponen bioaktif yang terkandung di dalam daun teh¹⁹. Selain itu, daun teh hijau memiliki kandungan polisakarida yang lebih tinggi dibandingkan daun sirsak yaitu sebesar 42,71%^{20,21}. Tingginya kadar polisakarida menyebabkan mikroba mendapatkan nutrisi tambahan selama proses fermentasi. Penelitian Suhardini dan Zubaidah tahun 2016 menyatakan bahwa kadar total gula pada kombucha daun teh lebih rendah bila dibandingkan dengan kombucha daun sirsak. Rendahnya total gula ini disebabkan karena glukosa akan digunakan sebagai nutrisi oleh mikroba selama proses fermentasi untuk menghasilkan asam organik, sehingga semakin rendah total gula yang tersisa maka kadar total asam pada kombucha akan semakin tinggi²².

Penurunan kadar total asam seiring dengan penurunan konsentrasi terjadi karena asam-asam organik yang terdapat dalam kombucha akan berkurang konsentrasinya karena telah terlarut dalam pelarut yang volumenya lebih besar²³. Hasil yang menunjukkan penurunan kadar total asam akibat pengenceran didukung oleh hasil penelitian Cairns tahun 2002 dan Vidal tahun 2017 bahwa pengenceran atau penurunan konsentrasi dapat menurunkan kadar total asam yang ditandai dengan perubahan warna yang cepat ketika ditambahkan NaOH^{24,25}.

Kemampuan Isolat BAL Kombucha Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) dalam Menghambat *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*

Hasil analisa uji aktivitas antibakteri isolat BAL kombucha daun sirsak menunjukkan bahwa tiap sampel memiliki daya hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Escherichia coli* dan *Salmonella*

typhi termasuk dalam anggota famili *Enterobacteriaceae* yang merupakan bakteri yang paling sering menginfeksi manusia. Bakteri ini memiliki variasi antigen permukaan yaitu O (somatik), H (flagella), dan K (Kapsul). Variasi antigen ini menjadi dasar dalam pengelompokan serotipe *Enterobacteriaceae*²⁶.

Pada penelitian ini didapatkan bahwa hasil zona inhibisi isolat BAL dari kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) lebih kecil jika dibandingkan dengan kombucha daun teh (*Camellia sinensis*) dan infusa daun sirsak meskipun tidak berbeda secara signifikan.

Mekanisme kerja isolat BAL kombucha daun teh (*Camellia sinensis*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri sama dengan isolat BAL kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) yaitu dengan cara memproduksi berbagai metabolit seperti asam organik, etanol, H₂O₂, diasetil, dan bakteriosin^{27,28}. Pada penelitian ini bakteriosin tidak berperan dalam pembentukan zona inhibisi dikarenakan menurut Phumkhachorn tahun 2015 dalam penelitiannya menyatakan bahwa bakteriosin tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif melalui ikatan dengan lipid II membran sel karena lapisan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif lebih tebal sehingga tidak terjadi pembentukan porus yang dapat menginaktivasi sel bakteri tersebut²⁹. Metabolit lain yang bekerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri yaitu asam organik yang dapat menyebabkan penurunan pH intrasel³⁰. Asam ini bersifat larut lemak sehingga dapat berdifusi dengan bebas ke dalam sitoplasma sel. Penurunan pH intrasel tersebut akan menyebabkan terjadinya denaturasi enzim dan peningkatan anion juga akan memicu terjadinya influks ion potasium (K⁺). Masuknya ion ke dalam sel akan meningkatkan turgor dan merusak osmolaritas sel sehingga pertumbuhan sel bakteri menjadi terhambat²⁸. Efek antimikrobal dari H₂O₂ disebabkan adanya proses oksidasi dari gugus sulfhidril sehingga menyebabkan rusaknya struktur enzim dan peroksidasi membran lipid yang akan menyebabkan permeabilitas membran meningkat dan menjadi prekursor terbentuknya radikal bebas bakterisidal seperti superoksida (O⁻²) dan hidroksil (OH⁻) yang dapat menyebabkan DNA bakteri rusak³⁰. Properti antimikroba lain yang dimiliki oleh isolat BAL adalah etanol yang bekerja dengan cara merusak membran sel dan menyebabkan denaturasi protein sel bakteri¹⁷.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Nguyen pada tahun 2015 yang menyatakan bahwa bakteri asam laktat strain *Lactobacillus* spp. yang diisolasi dari kombucha daun teh hitam memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Listeria monocytogens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, dan *Bacillus cereus*³¹. Selain itu, kadar etanol pada kombucha yang terbentuk selama 7 hari proses fermentasi adalah 0,32% dan akan menurun seiring bertambahnya waktu fermentasi^{32,33}. Rendahnya kadar alkohol pada kombucha dapat dijadikan landasan bahwa kombucha yang difermentasi selama 7 hari dapat dikatakan sebagai produk minuman halal berdasarkan Fatwa MUI No. 10 tahun 2018³².

Infusa daun sirsak dapat menghasilkan zona hambat terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Agunloye dan Onifade pada tahun 2020 menyatakan bahwa ekstrak air daun sirsak menghasilkan zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol³⁴. Pada penelitian yang dilakukan oleh Olusola et al. tahun 2017 juga mendukung bahwa infusa daun sirsak dapat menghasilkan zona inhibisi akibat adanya senyawa aktif seperti flavonoid, alkaloid, dan tanin yang dapat menembus dinding sel dan menghambat metabolisme sel bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*³⁵.

Flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri melalui beberapa jalur diantaranya adalah menghambat komunikasi antar sel sehingga tidak terjadi adhesi dan pembentukan *biofilm* oleh bakteri patogen. Selain itu, flavonoid dapat menghambat enzim permukaan seperti sortase, dan urease yang berfungsi untuk membantu bakteri bertahan hidup dalam keadaan asam di saluran cerna³⁶. Properti lain yang dimiliki daun sirsak untuk menghambat pertumbuhan bakteri adalah alkaloid. Alkaloid dapat merusak gen virulensi, inhibisi enzim sortase yang berfungsi dalam membantu proses adhesi bakteri, merusak fimbriae, dan menghambat pembentukan *biofilm*³⁷. Selain itu, tanin pada daun sirsak juga dapat mencegah pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis dinding sel, dan merusak membran sel³⁸.

Selama proses fermentasi terjadi perubahan kandungan senyawa bioaktif yang terdapat pada daun sirsak. Proses fermentasi menyebabkan peningkatan aktivitas dari flavonoid¹³ dan penurunan polifenol akibat proses degradasi oleh enzim yang disekresikan *yeast* dan bakteri³⁹. Penurunan beberapa kandungan dari daun sirsak selama proses fermentasi ini dapat menyebabkan menurunnya potensi dalam menghambat bakteri patogen. Menurut Jayabalan et al. tahun 2007, kemampuan antibakteri kombucha bergantung pada asam organik, etanol dan komponen mikroba yang terbentuk selama proses fermentasi³⁹.

Dari penelitian yang sudah dilakukan, kombucha daun sirsak memiliki kadar total asam yang lebih rendah tetapi memiliki potensi yang sama dengan kombucha daun teh dalam menghambat bakteri patogen. Hal ini mungkin terjadi karena aktivitas antibakteri tidak hanya dihasilkan oleh BAL kombucha, tetapi kandungan senyawa aktif utama yaitu flavonoid daun sirsak yang lebih aktif dibandingkan daun teh hijau^{40,41}. Untuk membuktikannya maka perlu dilakukan uji lebih lanjut terhadap kadar fenol dan flavonoid pada kombucha daun sirsak dan daun teh.

Berdasarkan uraian diatas, kombucha dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Tetapi ada beberapa efek negatif yang dapat ditimbulkan seperti pusing, mual, reaksi alergi, dan *lactic acidosis*. Gejala ini dapat muncul jika mengkonsumsi kombucha secara berlebih, proses pembuatan yang tidak higienis, dan kondisi konsumen yang memiliki sistem imun yang rendah. Selain itu, konsentrasi asam organik yang meningkat seiring bertambahnya waktu fermentasi akan berbahaya jika kombucha dikonsumsi secara langsung⁴².

Dari penelitian ini dapat diketahui bahwa meskipun infusa daun sirsak dapat menghasilkan zona inhibisi yang sama dengan kedua jenis kombucha, tetapi menurut penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati pada tahun 2014 menyatakan bahwa daun sirsak memiliki kadar tanin yang tinggi⁴³. Hal ini menyebabkan daun sirsak menjadi lebih pahit akibat tingginya kadar tanin. Tetapi rasa pahit ini akan berkurang seiring proses fermentasi sehingga daun sirsak dalam bentuk kombucha menjadi lebih unggul karena dapat mengurangi penambahan fruktosa pada minuman untuk mengurangi rasa pahit dari daun sirsak⁴⁴ dan menjadikan kombucha daun sirsak sebagai pilihan produk minuman probiotik.

KESIMPULAN

1. Kadar total asam kombucha daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) lebih rendah dibandingkan dengan kombucha daun teh (*Camellia sinensis*) namun lebih tinggi dibandingkan infusa daun sirsak.
2. Kombucha daun sirsak, kombucha daun teh, dan infusa daun sirsak tidak memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda secara signifikan terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini selanjutnya disarankan untuk:

1. Melakukan penelitian dengan prinsip 3 kali pengulangan dalam 3 waktu yang berbeda (*three times in triplicate*).
2. Menambahkan kontrol positif berupa antibiotik seperti amoksisilin untuk *Escherichia coli* dan kloramfenikol untuk *Salmonella typhi*.
3. Melakukan uji fitokimia pada kombucha daun sirsak, kombucha daun teh, dan infusa daun sirsak.
4. Melakukan pengukuran kadar etanol kombucha daun sirsak dan kombucha daun teh.
5. Melakukan analisa potensi probiotik dengan parameter yang lebih lengkap sehingga sesuai dengan syarat ideal probiotik lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan oleh Penulis kepada IOM (Ikatan Orangtua Mahasiswa) Fakultas Kedokteran UNISMA dan dr. Rahma Triliana, M. Kes., Ph.D sebagai *peer reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Parija SC. *Textbook of Microbiology and Immunology 2nd Edition*. Elsevier; 2012.

2. Kementrian Kesehatan. *Profil Kesehatan Indonesia 2012*. Jakarta: **Kementrian Kesehatan Republik Indonesia**; 2013.
3. Fahlevi MI. *Hubungan Lingkungan Dan Sanitasi Makanan Dengan Kejadian Demam Typhoid*. **Jurnal Seminar Nasional Teknologi Komputer dan Sains**. 2019.
4. Clements A, Young JC, Constantinou N, Frankel G. *Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli*. **Gut Microbes**. 2012;3(2):71–87.
5. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. *Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease*. **Immunological Reviews**. 2017;279(1):70–89.
6. Cheng HY, Ning MX, Chen DK, Ma WT. *Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens*. **Frontiers in Immunology**. 2019.
7. Astawan M, Wresdiyati T, Arief II, Febiyanti D. *Potensi bakteri asam laktat probiotik indigenous sebagai antidiare dan imunomodulator*. **Jurnal Teknologi dan Industri Pangan**. 2011;12(1):11–6.
8. Hrnjez D, Vaštag, Milanović S, Vukić V, Ilić M, Popović L, et al. *The biological activity of fermented dairy products obtained by kombucha and conventional starter cultures during storage*. **Journal of Functional Foods**. 2014;10:336–45.
9. Sánchez MZT-GASG-MRAG, García-Gómez C, Antonio Guzmán-Velasco Juan G. Báez-González, Márquez-Reyes JM. *Production of Microbial Cellulose Films*. **MDPI Coat**. 2020.
10. Aditiwati P, Kusnadi. *Kultur Campuran dan Faktor Lingkungan Mikroorganisme yang Berperan dalam Fermentasi "Tea-Cider"*. **ITB Journal of Science**. 2003;35(2):147–62.
11. Rahman FA, Haniastuti T, Utami TW. *Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (Annona muricata L.) pada Streptococcus mutans ATCC 35668*. **Majalah Kedokteran Gigi Indonesia**. 2017.
12. Ningsih RD, Zufahair, Kartika1 D. *Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsaks sebagai Antibakteri*. **Molekul**. 2016;11(1).
13. Bhattacharya D, Bhattacharya S, Patra MM, Chakravorty S, Sarkar S, Chakraborty W, et al. *Antibacterial Activity of Polyphenolic Fraction of Kombucha Against Enteric Bacterial Pathogens*. **Current Microbiology**. 2016;73(6):885–96.
14. Jayabalan R, Malba R V, Lon ES, Vitas JS, Sathishkumar M. *A Review on Kombucha Tea — Microbiology , Composition , Fermentation , Beneficial Effects , Toxicity , and Tea Fungus*. **Food Science and Food Safety**. 2014;13.
15. Tyl C, Sadler GD. *pH and Titratable Acidity*. **Food Analysis, Food Science Text Series**. USA: Springer; 2017. p. 389–406.
16. Ningsih AS, Ekowati CN, Sumard S, Farisi S. Uji Daya Antibakteri Isolat Bakteri Asam Laktat dari Kefir terhadap Bacillus sp. dan Escherichia Coli. **Biosf J Tadris Biol**. 2018;9(2):217–23.
17. Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives*. **Frontiers in Microbiology**. 2017;8(AUG):1–15.
18. Neffe-skocińska K, Sionek B, Ścibisz I. *Acid Contents and the Effect of Fermentation Condition of Kombucha Tea Beverages on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties*. **CyTA - Journal of Food**. 2017;15(4):601–7.
19. Horzic D, Kovac K, Belšč A, Vulic I. *Green Tea Preparation and its Influence on the Content of Bioactive Compounds*. **Food Research International**. 2010;43:167–76.
20. Wang Y, Liu Y, Huo J, Wei X. *Influence of Different Drying Methods on Chemical Composition and Bioactivity of Tea Polysaccharides*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2013;1–6.
21. Nurul N, Nik N, Daud M, Ya H, Norisham M, Rosdi M. *Integrative Cancer Science and Therapeutics Acetogenins of Annona muricata leaves : Characterization and Potential Anticancer Study*. **Integrative Cancer Science and Therapeutics**. 2018.
22. Suhardini PN, Zubaidah E. *Study of Antioxidant Activity on Various Kombucha Leaves During Fermentation*. **Jurnal Pangan dan Agro Industri**. 2016;4(1):221–9.
23. Febrianti M, Pertiwi D, Susanto WH. *Pengaruh Proporsi (Buah:Sukrosa) dan Lama Osmosis terhadap Kualitas Sari Buah Stroberi (Fragaria vesca L.)*. **Jurnal Pangan dan Agro Industri**. 2014;2(2):82–90.
24. Cairns AM, Watson M, Creanor SL, Foye RH. *The pH and Titratable Acidity of a Range of Diluting Drinks and Their Potential Effect on Dental Erosion*. **Journal of Dentistry**. 2002;30:313–7.
25. Vidal MG, Oliveira PHC, Lims-Arsati YBO, Rodrigues JA. *The Effect of Dilution on the Erosive Potential of Maltodextrin -Containing Sports Drinks*. **Journal of Dentistry**. 2017;46(1):28–32.
26. Jenkins C, Rentenaar ROBJ, Landraud L, Brisse S. *Enterobacteriaceae : Infectious Disease 4th edition*. **Elsevier**; 2014. p. 1565–78.
27. Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A. *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, fourth edition*. 2011. 1–761 p.
28. Vinderola G, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A. *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects 5th edition*. **CRC Press**; 2019.
29. Punyauppa-path S, Phumkhachorn P. *Nisin: Production and Mechanism of Antimicrobial*

- Action. **International Journal of Current Research and Reviews**. 2015;7(2):47–53.
30. Şanlıbaba P, Güçer Y. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria. **Journal of International Scientific Publication**. 2015;3:451–7.
 31. Nguyen NK, Dong NTN, Nguyen HT, Le PH. Lactic Acid Bacteria: Promising Supplements for Enhancing the Biological Activities of Kombucha. **Springerplus**. 2015;4(1):1–6.
 32. Ihsani N, Hernahadini N, Fauzi M. The Variation of Ethanol Concentration and Kombucha Characterization on Several Incubation Periods. **Journal of Physics: Conference Series**. 2021.
 33. Tan WC, Muhialdin BJ, Meor Hussin AS. Influence of Storage Conditions on the Quality, Metabolites, and Biological Activity of Soursop (*Annona muricata* L.) Kombucha. **Frontiers in Microbiology**. 2020;11.
 34. Agunloye OO, Onifade AK. *Annona muricata*: Comparative Assessment of the Antibacterial Activities of the Leaf and Stem Extracts against Multiple Antibiotic Resistant Clinical Isolates. **Journal of Advances in Microbiology**. 2020;20(5):12–21.
 35. Olusola SE, Fakoya S, Omaye IB. The Potential of Different Extraction Methods of Soursop (*Annona muricata* Linn) Leaves as Antimicrobial Agents for Aquatic Animals. **International Journal of Aquaculture**. 2017;7(18):122–7.
 36. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2011;38(2):99–107.
 37. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. *Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities* Vol. 44. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Elsevier B.V.; 2014. p. 377–86.
 38. Farha AK, Yang QQ, Kim G, Li H Bin, Zhu F, Liu HY, et al. Tannins as an Alternative to Antibiotics Vol. 38. **Food Bioscience**. Elsevier. 2020. p. 100751.
 39. Jayabalan R, Marimuthu S, Swaminathan K. Changes in Content of Organic Acids and Tea Polyphenols During Kombucha Tea Fermentation. **Food Chemistry**. 2007;102(1):392–8.
 40. Diniatik, Soemardi E, Indri K. Perbandingan Kadar Flavonoid Total dan Tanin Total pada Teh Hijau dan Teh Hitam *Camellia sinensis* (L.) O.K. Vol. 5. **Pharmacy**. 2007. p. 143–52.
 41. Febrianti DR, Niah R, Isfi. Analisis Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) pada Mencit Jantan Secara In Vivo. **Jurnal Ilmiah Ibnu Sina**. 2018;3(2):304–11.
 42. Khamidah A, Antarlina S. Peluang Minuman Kombucha Sebagai Pangan Fungsional. **Agrika Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian**. 2020;14(2):184–200.
 43. Rahmawati S, Rifqiyati N. Efektivitas Ekstrak Kulit Batang, Akar, dan Daun Sirsak (*Annona muricata* L) terhadap Kadar Glukosa Darah. **Jurnal Kaunia**. 2014;X(2):81–91.
 44. Tanjung R, Hamzah F, Efendi R. Lama Fermentasi terhadap Mutu Teh Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). **JOM Faperta**. 2016;3(2):1–9.