

PERBANDINGAN POTENSI KOMBUCHA DAUN SIRSAK (*Annona muricata*), BUNGA TELANG (*Clitoria ternatea*), DAN KOMBINASI KEDUANYA TERHADAP ZONA HAMBAT BAKTERI *Escherichia coli*

Rina Rosanti, Yoyon Arif Martino, Dini Sri Damayanti*

*Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Diare sering disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* yang membutuhkan pengendalian antara lain dengan pemberian probiotik. Salah satu produk herbal yang dapat menjadi probiotik adalah kombucha. Kandungan metabolit sekunder dalam daun sirsak dan bunga telang terbukti berpotensi sebagai antibakteri, namun belum diketahui efek kombucha daun sirsak, bunga telang dan kombinasi keduanya terhadap bakteri *E. coli*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek kombucha tersebut pada zona hambat *E. coli*.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan kombucha dari infusa daun sirsak, infusa bunga telang, dan kombinasi keduanya. Kombucha difermentasi selama 14 hari dan diuji efek antibakterinya dengan metode difusi cakram. Zona hambat diukur dengan software OptiLab versi 2.2. Analisa data dengan uji One Way ANOVA dan uji lanjutan Tukey dengan taraf signifikan $p < 0,05$.

Hasil: Daya hambat kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang dan kombucha kombinasi terhadap bakteri *E. coli* secara berturut-turut $8,91 \pm 0,43$ mm; $8,61 \pm 0,51$ mm; dan $9,20 \pm 0,53$ mm menunjukkan hasil yang berbeda signifikan ($p < 0,00$) dibandingkan kontrol siprofloksasin $35,24 \pm 0,72$ mm. Hal ini dikarenakan kemampuan penghambatan bakteri dipengaruhi oleh mekanisme antibakteri dari senyawa aktif yang terkandung.

Kesimpulan: Kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi memiliki aktivitas antibakteri lebih lemah dari siprofloksasin, namun berpotensi sebagai antibakteri sehingga bisa digunakan sebagai probiotik.

Kata kunci: Kombucha; Daun Sirsak; Bunga Telang; Siprofloksasin; *Escherichia coli*

*Korespondensi:

Dini Sri Damayanti

Jl. MT Haryono 193, Kota Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65145

e-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

COMPARISON OF THE POTENTIAL OF KOMBUCHA OF SOURSOP LEAF (*Annona muricata*), TELANG FLOWER (*Clitoria ternatea*), AND THE COMBINATION OF THE BOTH IN THE ZONE OF INHIBITION OF *Escherichia coli* BACTERIA

Rina Rosanti, Yoyon Arif Martino, Dini Sri Damayanti*

*Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Background: Diarrhea is often caused by *Escherichia coli* bacteria which requires control, among others, by administering probiotics. One of the herbal products that can be probiotics is kombucha. The content of secondary metabolites in soursop leaves and butterfly pea flowers has been shown to have antibacterial potential, however, the effect of kombucha in soursop leaves, butterfly pea flowers and their combination on *E. coli* bacteria is not yet known. This study aims to prove the effect of kombucha on the inhibition zone of *E. coli* bacteria.

Method: This study was an *in vitro* laboratory experimental study using kombucha from soursop leaf infusion, butterfly pea flower infusion, and a combination of both. Kombucha was fermented for 14 days and tested for its antibacterial effect by disc diffusion method. The inhibition zone was measured with OptiLab software version 2.2. Data analysis was carried out using the One Way ANOVA test and Tukey with a significant level of $p < 0,05$.

Result: The inhibition power of soursop leaf kombucha, butterfly pea flower kombucha and combination kombucha against *E. coli* bacteria were respectively $8,91 \pm 0,43$ mm; $8,61 \pm 0,51$ mm; and $9,20 \pm 0,53$ mm showed significant results ($p = 0,00$) compared to the ciprofloxacin control $35,24 \pm 0,72$ mm. This is because the ability to inhibit bacteria is influenced by the antibacterial mechanism of the active compounds contained.

Conclusion: Soursop leaf kombucha, butterfly pea flower kombucha, and combination kombucha had weaker antibacterial activity than ciprofloxacin, but has the potential as an antibacterial so it can be used as a probiotic.

Keywords: Kombucha; Soursop Leaf; Butterfly Pea; Siprofloksasin; *Escherichia coli*

*Correspondence:

Dini Sri Damayanti

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

e-mail: dinisridamayanti@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Diare merupakan masalah kesehatan endemik dengan potensial Kejadian Luar Biasa (KLB) yang sering menjadi salah satu penyebab kematian. Hasil data dari Kemenkes 2018 menunjukkan pada tahun 2013 prevalensi diare di Indonesia sebanyak 4,5% dan pada tahun 2018 meningkat menjadi 6,8%.¹ WHO *Global Burden of Foodborne Disease* melaporkan, secara global lebih dari 300 juta kasus diare dan hampir 200 ribu kematian setiap tahunnya disebabkan oleh *E. coli* diaregenik.²

Escherichia coli merupakan normal flora yang hidup pada usus manusia dan dapat menyebabkan penyakit apabila jumlahnya melebihi 10^6 sel/ml.³ Selain menyebabkan infeksi intestinal, *E. coli* juga bisa menyebabkan terjadinya penyakit infeksi ekstraintestinal seperti infeksi urogenital, pneumonia, bakteremia, dan meningitis.⁴

Pengobatan menggunakan antibiotik sering dipilih untuk mengatasi infeksi bakteri *Escherichia coli*.⁵ Antibiotik yang digunakan dengan irasional dapat menyebabkan resistensi dan penurunan normal flora intestinal, sehingga sangat diperlukan alternatif lainnya.³ Salah satu herbal yang dapat mengendalikan bakteri patogen intestinal adalah teh kombucha.

Kombucha merupakan produk herbal probiotik yang cukup banyak dikonsumsi dan terbukti memberikan manfaat.³ Kombucha dibuat dari infusa daun teh yang ditambahkan dengan SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) kemudian difermentasi. Hasil dari proses fermentasi kombucha yaitu asam-asam organik, polifenol serta alkohol yang berpotensi sebagai antibakteri.^{6,7} Selain itu, kombucha mengandung bakteri asam laktat yang merupakan mikroorganisme menguntungkan. BAL mampu bertahan hidup terhadap garam empedu dan asam lambung karena memiliki tingkat ketahanan hidup yang tinggi serta memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen sehingga dapat membantu mempertahankan keseimbangan mikrobiota intestinal. Kombucha dapat disebut sebagai probiotik jika terpenuhi beberapa syarat yaitu stabil terhadap garam empedu dan asam lambung, memiliki aktivitas antimikroba, dapat membentuk lingkungan mikroflora yang seimbang dan normal dan mengandung bakteri menguntungkan.^{8,9} Pada umumnya kombucha terbuat dari bahan dasar daun teh, namun saat ini sudah banyak dikembangkan menggunakan bahan herbal lain yang mengandung senyawa polifenol.

Salah satu bahan herbal yang berpotensi untuk bahan pembuatan kombucha dan memiliki kandungan senyawa polifenol adalah daun sirsak (*Annona muricata*) dan bunga telang (*Clitoria ternatea*). Daun *A. muricata* mengandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tanin, dan siklopeptida.^{10,11} Sedangkan bunga *C. ternatea* mengandung senyawa aktif flavonol glikosida, flavonoid, kuersetin glikosida, dan kaempferol glikosida. Senyawa-senyawa aktif tersebut memiliki potensi aktivitas sebagai antimikroba.¹² Namun belum pernah diteliti

aktivitas antibakteri sediaan kombucha berbahan dasar daun sirsak, bunga telang, dan kombinasi keduanya terhadap zona hambat bakteri *Escherichia coli* untuk membuktikan terpenuhinya syarat kombucha sebagai salah satu probiotik.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu, dan Tempat

Penelitian eksperimen laboratorium secara *in vitro* dengan *design* penelitian *post test only-control group*. Waktu penelitian November 2022 hingga Januari 2023 di LPRK Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang dan Laboratorium Biomedik FK UMM.

Sampel Penelitian

Simplisia daun sirsak dan bunga telang didapatkan dari UPT Materia Medika Batu. Sampel bakteri *Escherichia coli* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

Pembuatan Kombucha Daun Sirsak, Bunga Telang, dan Kombinasi

Kantung teh berisi 12 g serbuk simplisia daun sirsak, 12 g simplisia bunga telang, dan kombinasi 6 g daun sirsak dan 6 g bunga telang masing-masing dimasukkan ke dalam 1 L aquadest yang telah dididihkan selama 4 menit. Gula sebanyak 100 g ditambahkan ke dalam masing-masing infusa dan diaduk merata. Infusa daun sirsak, bunga telang dan kombinasi kemudian dipindahkan ke dalam jar kaca dan dibiarkan dingin pada suhu ruangan. Kultur SCOBY diinokulasikan ke dalam masing-masing jar kaca yang ditutup kain dan diikat karet. Infusa dibiarkan pada suhu ruangan tanpa paparan sinar cahaya matahari langsung selama 14 hari.¹³

Pengukurann Zona Hambat

Uji daya hambat dimulai dengan mengoleskan suspensi bakteri *E. coli* menggunakan *cotton swab* pada media MHA yang telah padat dan ditunggu hingga 10 menit. Tiga kertas cakram direndam pada masing-masing kombucha konsentrasi 100% selama 15 menit. Kontrol positif yang digunakan adalah cakram antibiotik siprofloksasin. Kemudian, kertas cakram ditaruh pada permukaan media MHA yang sebelumnya diberi suspensi bakteri *E. coli*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan lama waktu 24 jam. Dilakukan 9 kali pengulangan dalam percobaan ini dan dilakukan dalam satu waktu. Zona hambat diukur dengan *software OptiLab* versi 2.2.^{14,15}

Teknik Analisa Data

Data dianalisa dengan SPSS versi 26 memakai uji normalitas dan uji homogenitas dengan taraf signifikan $p > 0,05$, kemudian dilakukan uji *One Way ANOVA* dan uji lanjutan *Tukey* taraf signifikan $p < 0,05$.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Pengukuran Zona Hambat Kombucha Daun *A. muricata*, Kombucha Bunga *C. ternatea*, dan Kombucha Kombinasi Terhadap *Escherichia coli*

Hasil analisa statistik menyatakan kombucha daun *A. muricata*, kombucha bunga *C. ternatea*, dan kombucha kombinasi tidak berbeda secara signifikan ($p>0,05$), tetapi lebih rendah secara signifikan dibandingkan siprofloksasin ($p<0,05$). Hasil pengukuran zona hambat kombucha daun *A. muricata*, kombucha bunga *C. ternatea*, dan kombucha kombinasi terhadap bakteri *E. coli* dicantumkan pada **Tabel 1** dan **Gambar 1**.

Tabel 1. Rerata Hasil Pengukuran ZOI bakteri *E. coli*

Sampel	n	Zona Hambat (mm)
CIP	9	35,24±0,72 ^a
KS	9	8,91±0,43 ^b
KT	9	8,61±0,51 ^b
KK	9	9,20±0,53 ^b

Keterangan: Data dalam rerata 9 kali ulangan ± SD. Perbedaan notasi huruf menyatakan perbedaan signifikan ($p<0,05$). Siprofloksasin (CIP); Kombucha daun sirsak (KS); Kombucha bunga telang (KT); Kombucha kombinasi (KK).

PEMBAHASAN

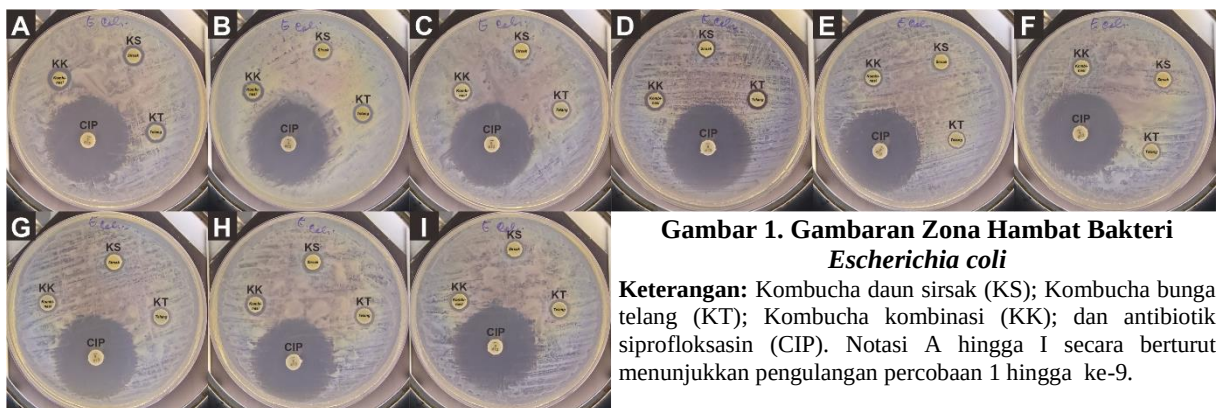
Daya Hambat Kombucha Daun Sirsak, Kombucha Bunga Telang, dan Kombucha Kombinasi Terhadap *E. coli*

Diketahui hasil dari pengukuran zona bening yang terbentuk bahwa kombucha daun sirsak (*Annona muricata*), kombucha bunga telang (*Clitoria ternatea*), dan kombucha kombinasi jika dibandingkan dengan siprofloksasin didapatkan hasil berbeda signifikan ($p<0,05$). Berdasarkan kriteria Davis Stout, hasil uji zona hambat kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi terhadap bakteri *E. coli* memiliki daya hambat sedang. Zona hambat dinyatakan memiliki daya hambat lemah apabila ZOI yang terbentuk < 5 mm, dinyatakan sedang apabila ZOI berkisar 5-10 mm, dinyatakan kuat apabila ZOI berkisar 11-20 mm, dan dinyatakan sangat kuat jika ZOI yang terbentuk >20 mm.¹⁶

Pada kontrol antibiotik siprofloksasin menunjukkan masih sensitif terhadap *E. coli* dengan nilai rata-rata 35,24±0,72 mm. Menurut standar *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), siprofloksasin termasuk golongan sensitif terhadap *E.coli* jika ZOI ≥ 26 mm, kategori intermediet jika 22-25 mm, dan golongan resisten jika diameter ZOI ≤ 21 mm.¹⁷ Siprofloksasin merupakan antibiotik golongan kuinolon yang bekerja melalui penghambatan DNA girase dan DNA topoisomerase IV sehingga menyebabkan gangguan pada replikasi dan transkripsi DNA bakteri.¹⁸ Hasil uji daya hambat siprofloksasin lebih baik dibandingkan kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi. Hal ini dikarenakan siprofloksasin merupakan senyawa murni dan sudah teruji sebagai antibiotik berspektrum luas yang efektif menghambat bakteri *E. coli*.

Pada penelitian ini, zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi disebabkan adanya senyawa aktif hasil dari fermentasi yaitu polifenol, etanol, dan asam organik yang berupa asam laktat, glukoronat, asetat, dan glukonat.^{7,13}

Asam organik sebagai antibakteri memiliki mekanisme yaitu mengganggu kestabilan pH sehingga menghambat sintesis protein bakteri. Adapun asam organik utama yang pasti terkandung pada kombucha yang dibuat adalah asam asetat. Selama fermentasi, asam glukoronat dan asetat mengalami peningkatan yang signifikan, sebaliknya asam sitrat dan laktat mengalami peningkatan yang sedikit.¹⁹ Hal ini dikarenakan kombucha memiliki ciri yang khas yaitu terdiri dari bakteri penghasil asam asetat yaitu *Acetobacter* sp dan *yeast*.²⁰ Senyawa asam asetat berpotensi merusak struktur lapisan lipid bilayer pada membran sel bakteri dengan meningkatkan jumlah proton intraseluler melewati pelepasan proton menuju sitoplasma sehingga sitoplasma menjadi asam. Proses tersebut mengakibatkan bakteri akan memindahkan proton untuk menetralkan kondisi tersebut sehingga energi sel bakteri berkurang dan terhambatnya pertumbuhan.²¹ Kadar asam asetat yang terkandung pada kombucha dipengaruhi oleh lama fermentasi. Waktu fermentasi yang memanjang akan menyebabkan asam asetat semakin meningkat.²²



Gambar 1. Gambaran Zona Hambat Bakteri *Escherichia coli*

Keterangan: Kombucha daun sirsak (KS); Kombucha bunga telang (KT); Kombucha kombinasi (KK); dan antibiotik siprofloksasin (CIP). Notasi A hingga I secara berturut menunjukkan pengulangan percobaan 1 hingga ke-9.

Semakin tinggi kandungan metabolit saat proses terjadi fermentasi pada kombucha yang berupa asam organik, maka pertumbuhan bakteri patogen semakin berpotensi terhambat.²³ Pada penelitian ini hanya dilakukan dengan satu rentang waktu lama fermentasi, sehingga perlu dilakukan eksplorasi perbedaan lama waktu fermentasi.

Selain mengandung bakteri asam asetat, kombucha juga mengandung bakteri asam laktat yang memproduksi senyawa bakteriosin untuk membunuh bakteri patogen.²⁴ Antibakteri bakteriosin memiliki mekanisme yaitu dengan merusak permeabilitas membran sitoplasma dan membentuk lubang pori pada membran sel yang menyebabkan PMF terganggu. Hal tersebut menyebabkan berhentinya seluruh reaksi yang memerlukan energi pada sel dan mengalami kematian.²⁵

Daun *A. muricata* mengandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tanin, dan siklopeptida, sedangkan bunga *C. ternatea* mengandung senyawa aktif flavonol glikosida, kuersetin glikosida, kaempferol glikosida, dan flavonoid.¹⁰⁻¹² Selama proses fermentasi terjadi peningkatan senyawa polifenol yang berasal dari daun sirsak dan bunga telang. Peningkatan tersebut disebabkan karena adanya proses metabolisme mikroba golongan bakteri dan khamir melalui reaksi enzimatik yang menghasilkan flavonoid, sehingga memengaruhi jumlah total fenol yang terdapat pada kombucha.⁷ Flavonoid sebagai antibakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri melalui mekanisme perubahan permeabilitas membran sel, penghambatan pada proses sintesis asam nukleat, penghambatan proses metabolisme energi, penghambatan pembentukan serta perlekatan biofilm.²⁶

Senyawa etanol yang dihasilkan selama proses fermentasi kombucha juga memiliki potensi sebagai antibakteri. Mekanisme antibakteri etanol yaitu melalui peningkatan permeabilitas membran sel, penghambatan ikatan silang peptidoglikan dan menginduksi lisisnya membran sel.²⁷ Kadar etanol/alkohol akan semakin menurun seiring lamanya proses fermentasi, dikarenakan *Acetobacter* sp mengubah alkohol menjadi asam.²⁸ Menurut Sulistiawaty (2022) rata-rata hasil akhir kadar alkohol kombucha <0,5%, sehingga termasuk ke dalam batas kadar alkohol yang dihalalkan oleh MUI. Suatu produk fermentasi dengan kadar alkohol <0,5% dapat disebut produk yang halal jika tidak membahayakan secara medis.^{29,30}

Potensi Kombucha Sebagai Probiotik

Probiotik merupakan pangan yang mengandung sejumlah mikroorganisme menguntungkan yang memberikan manfaat untuk kesehatan. Adapun kombucha disebut sebagai produk probiotik apabila memenuhi beberapa kriteria yaitu, tidak bersifat patogen, mengandung koloni mikroorganisme menguntungkan, toleransi terhadap keadaan asam dan cairan empedu, adhesi pada mukosa epitel intestinal, serta memiliki aktivitas antimikroba. Selain itu, menurut BPOM kombucha dapat disebut

sebagai probiotik atau pangan fungsional yang layak dikonsumsi apabila memiliki karakteristik sensori yaitu tekstur, warna, aroma, serta cita rasa tertentu sehingga mudah diterima konsumen.⁸

Pada penelitian ini hanya dilakukan salah satu kriteria probiotik yaitu dengan pengujian aktivitas antibakteri, sehingga perlu dilakukan pengujian terhadap karakteristik lainnya untuk mengetahui potensi kombucha daun sirsak, bunga telang dan kombinasi keduanya sebagai probiotik. Adapun aktivitas antibakteri kombucha lebih lemah dibandingkan kontrol antibiotik, hal ini dikarenakan kombucha merupakan produk probiotik yang mengandung asam organik dan mikroorganisme menguntungkan yang dapat mengganggu stabilitas bakteri patogen serta mempertahankan mikrobiota intestinal, sedangkan antibiotik merupakan senyawa murni yang bekerja secara langsung melawan bakteri.⁹

Pengulangan penelitian ini dilakukan sebanyak 9 kali, namun memiliki kelemahan yaitu dilakukan dalam satu waktu. Suatu percobaan yang hanya dilakukan dalam satu waktu menyebabkan kesalahan dalam percobaan tidak dapat dibedakan antar perlakuan. Oleh sebab itu, diperlukan percobaan dengan variasi waktu pengulangan agar dapat memperluas dalam penarikan kesimpulan dan validitas dari penelitian dapat diperoleh secara maksimal.³¹

KESIMPULAN

Kombucha bunga telang, dan kombucha kombinasi memiliki potensi antibakteri lebih lemah dari siprofloksasin, namun menunjukkan potensi daya hambat sedang yang bisa digunakan sebagai probiotik.

SARAN

Saran untuk penelitian berikutnya antara lain :

1. Melakukan variasi lama fermentasi 7, 14, dan 21 hari.
2. Melakukan variasi komposisi dengan gram berbeda.
3. Melakukan ulangan dalam 3 waktu berbeda.
4. Melakukan pengujian menggunakan kontrol produk probiotik dan kontrol antibiotik lainnya.
5. Melakukan uji skrining fitokimia alkaloid dan terpenoid.
6. Melakukan pengujian nilai pH.
7. Melakukan pengujian total BAL.
8. Melakukan pengujian resistan BAL terhadap garam empedu dan pH rendah.
9. Melakukan pengujian *in vivo* mikrobiota intestinal untuk membuktikan efektivitas probiotik kombucha daun sirsak, kombucha bunga telang, dan kombinasi pada hewan coba.
10. Melakukan pengukuran kadar alkohol pada kombucha
11. Tes rasa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNISMA yang telah memberikan bantuan finansial dan dr. Rahma Triliana, M.Kes., PhD. sebagai *peer reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. Hasil Riset Kesehatan Dasar. 2018.
2. Alison W, Jennifer C. *Escherichia coli* Diarrheagenic. [Internet]. 2019.
3. Effendi F, Roswien A, Stefani E. Uji Aktivitas Antibakteri Teh Kombucha Probiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. **Jurnal Ilmiah Farmasi**. 2014;4(2):1–9.
4. Mueller M, Tainter C. *Escherichia Coli*. **StatPearls Publishing**. [Internet]. 2022 Oct 17.
5. Susanti S. Hubungan Karakteristik Orang Tua dengan Pengetahuan Pemberian Antibiotika pada Anak di Jorong Balai Ahad Lubuk Basung. **Human Care Journal**. 2018;2(2):1–7.
6. Rezaldi F, Hidayanto F, Setyaji D, Fathurrohman M, Kusumiyati. Bioteknologi Kombucha Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) Sebagai Antibakteri *Streptococcus mutan* dan *Klebsiella pneumoniae* Berdasarkan Konsentrasi Gula yang Berbeda-beda. **Jurnal Farmagazine**. 2022;9(2):21–27.
7. Suhardini P, dan Zubaidah E. Study of Antioxidant Activity on Various Kombucha Leaves During Fermentation. **Jurnal Pangan Dan Agroindustri**. 2016;4(1):221–229.
8. Shi L, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Mohd Ismail N, Yin, O. Beneficial properties of probiotics. **Tropical Life Sciences Research**. 2016;27(2): 73–90.
9. Adawiyah S, Hafsan, Nur F, Mustami M. Ketahanan Bakteri Asam Laktat Asal Dangke Terhadap Garam Empedu Sebagai Kandidat Probiotik. **Mikrobiologi Kesehatan dan Lingkungan**. 2015;1(1):1-10.
10. Qorina F, Arsianti A, Fithrotunnisa Q, Tejaputri A. Phytochemistry and Antioxidant Activity of Soursop (*Annona muricata*) Leaves. **International Journal of Applied Pharmaceutics**. 2019;11(6):1–6.
11. Moghadamtousi, Zorofchian S, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali H, Kadir H. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**. 2015;16(7):15625–15658.
12. Wiyantoko B, Astuti A. Butterfly Pea (*Clitoria Ternatea* L.) Extract As Indicator of Acid-Base Titration. **Indonesian Journal of Chemical Analysis**. 2020;3(1):22–32.
13. Al-Mohammadi A, Ismaiel, Ibrahim R, Moustafa A, Zeid A, Enan G. Chemical Constitution and Antimicrobial Activity of Kombucha Fermented Beverage. **Molecules**. 2021;26(16):11–13.
14. Hudaya A, Radiastuti N, Sukandar D, Djajanegara I. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Bunga Kecombrang. **Jurnal Biologi**. 2014;7(1):9–15.
15. Nurhayati L, Yahdiyani N, Hidayatulloh A. Perbandingan Pengujian Aktivitas Antibakteri Starter Yogurt dengan Metode Difusi Sumuran dan Metode Difusi Cakram. **Jurnal Teknologi Hasil Peternakan**. 2020;1(2):41–46.
16. Nurgustiyanti, Abriyani E, Mursal L. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) dan Uji Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*. **Jurnal Buana Farma**. 2021;1(4):21–28.
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020.
18. Puspita I, Qurrotul N, Sumarsono T, Andini A. Uji Sensitivitas *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Air Sumur Galian Dekat dengan Septic Tank Terhadap Ciprofloxacin. **Nasional Conference for Ummah**. 2020;1(1):1–7.
19. Jayabalan R, Marimuthu S. Swaminathan K. Changes In Content of Organic Acids and Tea Polyphenols During Kombucha Tea Fermentation. **Food Chemistry**. 2007;102(2007):392–398.
20. Simanjuntak R, Kurniawaty E. Efek Antibakteri Kopi Robusta yang Difermentasi dengan Kombucha Terhadap *Salmonella typhi*. **Agromedicine**. 2019;6(1):83–88.
21. Romanna S, Hanna M. Pengaruh Pemberian Teh Kombucha Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. **Majority**. 2016;5(5):48–55.
22. Pratiwi A, Elfita, Aryawati R. Pengaruh Waktu Fermentasi Terhadap Sifat Fisik dan Kimia pada Pembuatan Minuman Kombucha dari Rumput Laut *Sargassum* sp. **Maspuri Journal**. 2012;4(1):131–136.
23. Rezaldi F, Rachmat O, Fadillah M, Setyaji D, Saddam A. Bioteknologi Kombucha Bunga Telang (*Clitoria Ternatea* L) Sebagai Antibakteri *Salmonella thypi* dan *Vibrio parahaemolyticus* Berdasarkan Konsentrasi Gula Aren. **Jurnal Gizi Kerja dan Produktivitas**. 2022;3(1):13–22.
24. Zubaidah E, Fibrianto K. Potensi Kombucha Daun Teh (*camellia sinensis*) dan Daun Kopi Robusta (*coffe robusta*) Sebagai Minuman Probiotik. **Jurnal Bioteknologi dan Biosains**. 2021;8(2):185–195.
25. Fatimah M, Megantara I, Anggaeni T. Pemanfaatan Bakteriosin dari Produk Fermentasi Sebagai Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*. **Indonesia Medicus Veterinus**. 2020;9(5):835–848.
26. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-activity Relationship and Mechanism. **Current Medicinal Chemistry**. 2014;22(1):132–149.
27. Ingram L. Mechanism of Lysis of *Escherichia coli* by Ethanol and Other Chaotropic Agents. **Journal of Bacteriology**. 1981;146(1):331–336.

28. Majidah L, Gadizza C, Gunawan S. Analisis Pengembangan Produk Halal Minuman Kombucha. **Halal Research**. 2022;2(1):36–51.
29. Majelis Ulama Indonesia. Produk Makanan dan Minuman yang Mengandung Alkohol/Etanol. 2018.
30. Sulistiawaty L, Solihat I. Kombucha: Fitokimia dan Studi Kritis Tingkat Kehalalan. **Warta Akrab**. 2022;46(1):21–27.
31. Barkah M, Hakim R, Damayanti DS. Pengaruh Lama Fermentasi Kombucha *Annona Muricata* L. pada Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri. **Skripsi, Fak Kedokt Univ Islam Malang**. 2021.