

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Daun Kelor

1. Definisi

Daun kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan tumbuhan dari keluarga *Moringaceae* yang dikenal sebagai tanaman tropis multifungsi yang berasal dari India, Pakistan, Bangladesh dan Afghanistan. Menurut Susanti dan Nurman (2022) tanaman kelor dapat diklasifikasikan sebagai berikut ;

Kingdom : *Plantae*
Sub kingdom: *Tracheobionta (vascular plants)*
Superdivisi : *Spermatophyta (seed plants)*
Divisi : *Angiosperms*
Kelas : *Eudicots*
Subkelas : *Dilleniidae*
Ordo : *Brassicales*
Famili : *Moringaceae*
Genus : *Moringa*
Spesies : *Moringa oleifera*

Tanaman ini dapat tumbuh di berbagai kondisi lingkungan, termasuk wilayah tropis dan subtropis serta toleran terhadap kekeringan sampai 6 bulan. Tumbuhan ini berupa perdu atau pohon, berakar kuat, batang berkayu rapuh, tegak berwarna putih kotor, permukaan kasar, dan bercabang. Kelor mempunyai bentuk daun majemuk dengan berukuran kecil yang tersusun spiral. Tanaman ini dapat tumbuh tinggi mencapai 7 – 11 meter dan mudah ditemukan di wilayah dataran rendah hingga

ketinggian 700 meter di atas permukaan laut. Kelor mekar dengan bunga berwarna kuning keputihan dan memiliki aroma yang khas sepanjang tahun. Kelor memiliki buah berbentuk segitiga yang panjang sekitar 20 hingga 60 cm. Buah kelor berwarna hijau saat muda, namun berubah menjadi coklat seiring bertambahnya usia. Tanaman ini memiliki rasa yang agak pahit, bersifat netral dan tidak beracun (Khasanah, dkk 2023).



Gambar 1. Daun Kelor
(Mutar, Al-Rawi, & Mohammed, 2021)

2. Kandungan

Kelor adalah flora yang kaya akan nutrisi dan dikenal sebagai “*miracle tree*” dikarenakan semua bagian dari daun kelor memiliki banyak manfaatnya. Kandungan nutrisi tersebar di tanaman kelor mulai dari daun, kulit batang, bunga, buah, sampai dengan akarnya diketahui sebagai tanaman obat. Tanaman ini memiliki kandungan antioksidan dan antibakteri yang tinggi pada bagian daunnya (Azijah, dkk., 2023). Di dalam daun kelor terbukti mengandung senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas oksidan dan antibakteri seperti:

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Senyawa ini dapat

menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu membran sel bakteri dan menginaktivasi enzim-enzim penting.

b. Tannin

Tannin merupakan senyawa polifenol yang memiliki sifat astrigen dan dapat berfungsi sebagai antibakteri. Tanin mampu mengikat protein pada permukaan bakteri, sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sel dan menghambat pertumbuhan bakteri.

c. Saponin

Saponin adalah senyawa yang mampu membentuk busa dan memiliki aktivitas antibakteri. Saponin bekerja dengan merusak membran sel bakteri, sehingga menyebabkan kebocoran isi sel dan kematian bakteri.

d. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa nitrogen yang sering kali memiliki dampak farmakologis. Beberapa alkaloid dalam daun kelor dapat berfungsi sebagai agen antibakteri dengan mengganggu proses metabolisme bakteri.

e. Asam fenolat

Asam fenolat juga merupakan komponen penting dalam daun kelor yang menunjukkan aktivitas antibakteri. Senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan berbagai jenis bakteri patogen.

f. *Glucosinalat*

Glucosinalat adalah *prekursoir isothiocyant* dan merupakan senyawa yang ditemukan dalam berbagai tanaman, termasuk daun

kelor. Senyawa ini memiliki aktivitas anti-kanker yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dengan cara mencegah proliferasi sel dan apoptosis. Selain sebagai anti-kanker *glucosinolat* juga memiliki aktivitas antioksidan yang efektif dalam melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas. Senyawa ini berfungsi dengan cara mengubah status redoks dalam sel, sehingga mengurangi produksi radikal bebas dan melindungi DNA, protein, dan lipid dari kerusakan oksidatif (Siskawati, Haeruddin, & Nurlansi 2023).

g. *Isothiocyanat*

Isothiocyanat merupakan senyawa yang terbentuk dari hidrolisis *glucosinolate*, sebuah jenis senyawa sulfur yang ditemukan dalam berbagai tanaman, termasuk daun kelor. Senyawa ini memiliki aktivitas anti-inflamasi yang dapat menghambat inflamasi dengan cara mengganggu proses inflamasi dan reduksi peradangan. Selain itu *isothiocyanat* memiliki aktivitas antivirus yang efektif melawan virus-virus patogen (Fauziah dkk., 2023).

3. Manfaat

Daun kelor dikenal sebagai “*miracle tree*” atau “*tree for life*” karena kandungan mineral dan vitaminnya yang tinggi. Kelor banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai bahan pangan dan obat tradisional seperti teh, tepung, obat sakit kepala, demam, sariawan, sakit tenggorokan, obat kudis, dan dapat mengontrol kadar gula darah. Batang kelor juga digunakan sebagai obat maag, kanker, tumor, dan

peradangan. Masyarakat memanfaatkan buah dan biji kelor sebagai obat rematik. Bunga kelor saat ini banyak dimanfaatkan masyarakat sebagai obat kolesterol, gangguan lambung, tumor dan kanker (Susanti & Nurman, 2022).

B. Kombucha

1. Definisi

Kombucha adalah minuman probiotik yang dibuat melalui fermentasi substrat teh dan gula menggunakan starter kombucha yang disebut SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteria and Yeast*). Simbiosis kultur ini terdiri dari bakteri *Acerobacter xylinum* dan beberapa spesies khamir seperti *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, dan *Zygosaccharomyces*. Kombucha sudah dikenal masyarakat sejak zaman dahulu kala (Kitwetcharoen et al., 2023).

Kombucha pertama kali dikonsumsi oleh masyarakat di dataran Tiongkok. Masyarakat di sana sudah mengenal jenis teh fermentasi ini selama 3000 tahun. Orang Cina memberi minuman ini nama dengan “Teh Kesehatan.” Kombucha menyebar dari Tiongkok melalui jalur perdagangan dan akhirnya mencapai seluruh belahan dunia. Nama kombucha berasal dari seorang dokter Korea bernama “*Kombu*”, yang memperkenalkan teh ini kepada Kaisar Jepang, Inkyo untuk mengobati sembelitnya pada tahun 414 Masehi dan “*cha*” yang memiliki arti teh dalam bahasa Jepang (Kitwetcharoen, et al., 2023).

Minuman ini dikenal dengan banyak nama seperti teh jamur, teh Kargosok, teh jamur India, jamur Manchu, *teakwass* dan banyak lainnya.

Pada dasarnya kombucha dapat dibuat dari berbagai jenis teh seperti teh hitam, teh hijau, bahkan teh herbal. Selain itu, variasi rasa bisa ditambahkan melalui buah-buahan, rempah-rempah bahkan bahan alami lainnya selama proses fermentasi sekunder (Anantachoke, et al., 2023).



Gambar 2. *Kombucha*
(Getty & Gaikwad, 2019)

2. Proses Fermentasi

Kombucha merupakan minuman fermentasi yang dihasilkan melalui proses interaksi antara mikroorganisme, khususnya bakteri dan ragi dalam larutan teh. Fermentasi kombucha dilakukan selama 1 – 2 minggu. Proses fermentasi ini meliputi dua tahap utama yaitu fermentasi alkohol dan fermentasi asam asetat yang terjadi secara bersamaan dan saling berkaitan. Proses fermentasi kombucha diawali dengan penambahan SCOBY (*Symbiotic Culture Of Bacteri and Yeast*) ke dalam larutan teh manis. Ragi, khususnya dari genus *Saccharomyces* menggunakan enzim invertase untuk menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa kemudian diubah menjadi etanol dan karbon dioksida melalui jalur glikolitik. Selama proses ini, gas karbon dioksida yang dihasilkan berkontribusi terhadap karbonisasi kombucha,

menghasilkan etanol sebagai produk utama fermentasi anaerobik (Kitwetcharoen, et al. 2023).

Setelah fermentasi alkohol, bakteri asam asetat seperti *Acetobacter xylinum* berperan penting dalam oksidasi etanol menjadi asam asetat. Proses ini terjadi dalam lingkungan aerobik di mana bakteri menggunakan oksigen untuk mengubah etanol menjadi asetaldehida dan kemudian menjadi asam asetat. Asam asetat yang terbentuk berdisosiasi dalam larutan, melepaskan proton bebas yang menyebabkan penurunan pH media. Penurunan pH ini menunjukkan adanya penumpukan asam organik selama proses fermentasi. Selain asam asetat bakteri juga menghasilkan asam glukonat melalui oksidasi glukosa. Asam glukonat memiliki sifat antibakteri dan berkontribusi terhadap manfaat kesehatan kombucha (Rahmi Hafsari, dkk., 2021).

Ketika asam organik terakumulasi selama fermentasi, pH berubah secara signifikan. Semakin lama proses berlangsung maka semakin rendah nilai pH yang diukur. Selama fermentasi, *Acetobacter* juga memetabolisme selulosa yang membentuk lapisan membran pada permukaan kombucha. Lapisan ini tidak hanya berfungsi sebagai pelindung, tetapi juga menyediakan lingkungan aerobik yang optimal di mana bakteri dapat berfungsi secara efektif. Pembentukan selulosa dipicu dengan adanya keberadaan oksigen yang cukup di permukaan lingkungan (Kitwetcharoen, et al., 2023).

Di samping itu, senyawa fenolik yang terdapat pada teh juga mengalami perubahan selama proses fermentasi. Aktivitas enzimatik

mikroorganisme memecah senyawa fenolik menjadi bentuk yang lebih bioaktif sehingga meningkatkan kekuatan antioksidan kombucha. Namun terjadi juga penurunan aktivitas antioksidan dan penurunan pH yang ekstrem sehingga dapat merusak struktur senyawa fenolik. Beberapa faktor seperti jenis dan jumlah bahan baku, kultur starter, kadar dan jenis gula, suhu serta waktu fermentasi mempengaruhi sifat fisikokimia produk kombucha yang dihasilkan, termasuk berbagai komponen yang pada akhirnya mempengaruhi aktivitas biologisnya (Anantachoke et al., 2023).

Semakin lama waktu fermentasi maka semakin banyak asam asetat yang dihasilkan sehingga menambah rasa asam pada kombucha. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa waktu fermentasi yang lebih lama dapat meningkatkan keasaman secara keseluruhan dan mengubah sifat organoleptik kombucha. Di samping itu, semakin lama waktu fermentasi maka pH juga semakin menurun. Penurunan pH ini dapat mempengaruhi stabilitas mikroba dan keamanan produk. Selain itu, komposisi kimia kombucha sangat bervariasi tergantung pada jenis teh dan bahan yang digunakan dalam proses fermentasi (Anantachoke et al., 2023).

3. Kandungan

Kombucha merupakan minuman yang mengandung probiotik. Kombucha mengandung 50 probiotik yang berbeda, enzim, asam amino, dan vitamin. Mikroorganisme probiotik dalam kombucha mampu menyeimbangkan mikrobiota usus yang dapat mempengaruhi sumbu HPA. Kandungan bakteri yang sering terdapat pada campuran probiotik berasal

dari bakteri asam laktat atau *Bifidobacteria* maupun campur keduanya. Kombucha juga mengandung prebiotik (Kitwetcharoen et al., 2023).

Prebiotik secara selektif mendukung pertumbuhan dan aktivitas mikroorganisme bermanfaat di usus manusia. Bakteri dan ragi dalam minuman ini berperan sebagai probiotik dan mikroselulosa, mendukung pertumbuhan mikroorganisme bermanfaat di dalam usus. Secara umum komponen kimia yang terdapat pada kombucha adalah protein, gula, polifenol, asam organik (asam asetat, asam glukonat, asam glukuronat, asam laktat dan asam oksalat), etanol, vitamin dan mineral. Vitamin yang terdapat pada kombucha antara lain vitamin B1, B2, B6, B12 dan C. Sedangkan mineral pada kombucha yakni mangan, besi, nikel, tembaga, seng, timbal, kobalt, kromium, kadmium. Di samping mengandung vitamin dan mineral kombucha juga mengandung anion yakni fluorida, klorida, bromida, iodida, nitrat, fosfat dan sulfat (Riswanto & Setiawan, 2022).

4. Manfaat

Kombucha memiliki banyak manfaat bagi kesehatan manusia, antara lain dektifikasi darah, menurunkan kadar kolesterol, tekanan darah, kalsifikasi ginjal, inflamasi, radang sendi, rematik, gejala asam urat, obesitas, gangguan haid, *hot flashes menopause*, insomnia, stres dan gangguan syaraf. Kombucha juga diketahui merangsang fungsi hati, sistem endokrin, sistem kekebalan tubuh dan produksi interferon, meningkatkan kesehatan kulit, kuku dan mata, menormalkan aktivitas usus dan menyeimbangkan flora usus serta mencegah perkembangan infeksi

kandung kemih (Kitwetcharoen et al., 2023). Selain itu adapun beberapa manfaat utama dari kombucha bagi kesehatan antara lain.

a. Aktivitas Antioksidan

Kombucha mengandung beberapa jenis antioksidan, termasuk senyawa polifenol. Antioksidan ini melawan radikal bebas dalam tubuh, melindungi sel dari kerusakan oksidatif dan mengurangi risiko penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung. Kombucha mengandung radikal DPPH dan ABTS yang tinggi, menunjukkan aktivitas yang tinggi. Selain itu, kombucha menghambat peroksidasi asam linoleat dan mengkelat senyawa logam yang memiliki efek pro-oksidan. Sifat antioksidan kombucha dapat membantu mencegah penyakit kronis. Penelitian menunjukkan bahwa kombucha mencegah penyakit kronis dan memiliki sifat antihiperglikemik, antioksidan, dan antikarsinogenik (Anantachoke, et al., 2023).

b. Aktivitas Antimikroba

Kombucha telah diketahui memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap berbagai mikroorganisme gram positif dan gram negatif. Sifat antibakteri kombucha berkaitan dengan berbagai komponen kombucha termasuk polifenol, asam organik dan senyawa lain yang dilepaskan dari bahan bakunya. Kombucha dari hitam tidak hanya menunjukkan aktivitas antibakteri yang tinggi untuk menghambat berbagai patogen bawaan makanan, tetapi juga aktivitas anti jamur yang tinggi (Kitwetcharoen et al., 2023).

c. Aktivitas Anti-Inflamasi dan Antikanker

Dalam beberapa tahun terakhir, kombucha terbukti memiliki sifat anti-inflamasi dan anti kanker karena tingginya kandungan polifenol dan metabolit penting lainnya yang dihasilkan dari berbagai reaksi metabolisme selama fermentasi. Kombucha telah terbukti memiliki kemampuan sitotoksik untuk menghancurkan sel kanker karena komponen kuat yang ada dalam daun teh dan metabolit yang dikeluarkan oleh aktivitas SCOBY. Berdasarkan beberapa penelitian teh hitam kombucha menunjukkan sitotoksitas yang lebih besar secara efektif melawan sel kanker usus besar daftar dibandingkan sel normal. Kombucha teh hitam yang dimasak masih menunjukkan sitotoksitas yang signifikan terhadap sel kanker Caco2. Selain itu, kehadiran berbagai asam organik dan pH pada kombucha meningkatkan efek anti-kanker, terutama toksisitas sel kanker usus besar Cao2 (Kaewkod, Bovonsombut, & Tragoolpua 2019).

C. *Bacillus cereus*

1. Definisi

Bacillus cereus adalah bakteri gram positif berbentuk batang, motil, dan bersifat aerobik fakultatif. *Bacillus cereus* banyak terdapat di tanah, udara, dan berbagai makanan. Bakteri ini dikenal sebagai patogen yang dapat menyebabkan penyakit bawaan makanan melalui infeksi dan intoksikasi makanan (Mills, et al, 2022). Bakteri ini memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*

Divisio : *Firmicutes*
Class : *Bacilli*
Ordo : *Bacillales*
Family : *Bacillaceae*
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus cereus*

Secara morfologi bakteri ini berbentuk batang atau basil dan dapat membentuk rantai panjang. Sel-selnya memiliki panjang antara 3,0 hingga 5,0 μm dan lebar 1,0 sampai 1,2 μm , memiliki koloni berwarna merah muda serta lesitinase positif. Bakteri ini dapat membentuk endospora yang tahan terhadap kondisi ekstrem seperti suhu tinggi dan kekeringan. Spora dari bakteri ini biasanya terletak di posisi subterminal dalam sel. Spora yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* memiliki *fimbriae* dan bersifat lebih hidrofobik sehingga spora dapat menempel pada berbagai jenis permukaan (Apriliansyah, Zuhrotun, & Astrini, 2022).

Bacillus cereus umumnya dianggap sebagai bakteri mesofilik dengan suhu pertumbuhan 10 – 50°C dan suhu optimum 28 – 37°C. Patogen ini dapat tumbuh pada pH 4,3 dan 9,3 dengan pH optimum antara 6,0 dan 7,0. *Bacillus cereus* dapat membentuk biofilm sehingga sulit untuk dilakukan pembersihan maupun desinfeksi pada permukaan yang terkontaminasi (Apriliansyah, Zuhrotun, & Astrini, 2022).



Gambar 3. Bakteri *Bacillus cereus*
(Yudhistira et al., 2017)

2. Patogenesis

Bacillus cereus banyak ditemukan di lingkungan, antara lain tanah, debu, dan air. Bakteri ini dapat mencemari berbagai jenis makanan, terutama makanan kering seperti biji-bijian, rempah-rempah, dan produk susu. Spora dari *Bacillus cereus* dapat bertahan hidup meski dalam kondisi lingkungan ekstrem bahkan sering kali tidak mati selama proses pemanasan. Ketika makanan yang terkontaminasi dikonsumsi, spora dapat tertelan dan melewati lambung. Setelah memasuki usus kecil, spora *Bacillus cereus* berkecambah menjadi sel vegetatif. Proses ini dipengaruhi oleh lingkungan di dalam usus seperti pH dan suhu (Ehling-Schulz et al., 2019). Sel-sel vegetatif ini mulai berkembang biak dan menghasilkan berbagai toksin yang menyebabkan gejala keracunan makanan yakni:

a. Toksin Emetik

Bacillus cereus dapat menghasilkan toksin ini selama proses pertumbuhan di dalam makanan yang terkontaminasi. Toksin emetik dikenal sebagai *cereulide* merupakan peptida kecil dengan berat molekul sekitar 1,2 kDa dan bersifat tahan panas. Toksin ini stabil pada rentang pH 2 sampai 11 dan dapat bertahan pada suhu tinggi

yakni 121⁰C selama 90 menit. *Cereulide* diserap melalui dinding usus halus, toksin ini berikatan dengan reseptor 5-HT3 (serotonin) pada sel saraf vagus di usus (Schulz, Lereclus, and Koehler, 2019).

Reseptor ini berperan penting dalam merangsang pusat muntah di otak. Ketika dihubungkan dengan reseptor, *cereulide* mengirimkan sinyal ke sistem saraf pusat, khususnya medula oblongata, yang mengontrol refleks muntah. Gejala keracunan akibat toksin ini, umumnya muncul dalam 1 – 6 jam setelah mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi. Gejala yang muncul dapat berupa mual, muntah dan diare ringan (Schulz, Lereclus, and Koehler, 2019).

b. Toksin Enterotoksin

Toksin ini memiliki berat molekul lebih besar dibandingkan *cereulida* dan dapat terurai pada suhu tinggi, meskipun beberapa juga tahan panas. Enterotoksin yang dihasilkan oleh *Bacillus cereus* antara lain *hemolysin BL* (HBL), *nonhemolytic enterotoxin* (NHE), dan sitotoksin K. HBL memiliki aktivitas hemolitik, nekrotik dan dapat menyebabkan penumpukan cairan di lengkungan *rabbit ileal* sehingga meningkatkan sekresi cairan usus. Sedangkan NHE dapat menyebabkan lisis osmotik dengan membentuk pori-pori trans membran dan sitotoksin terlibat dalam enteritis nekrotik dan dapat menyebabkan kerusakan jaringan usus. Gejala yang diakibatkan toksin ini ditandai dengan diare berair, nyeri dan kram perut. Gejala ini muncul dalam waktu 12 – 24 jam setelah mengkonsumsi makanan yang terkontaminasi (Dietrich, et, al. 2021).

D. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri merupakan serangkaian metode yang digunakan untuk menentukan kemampuan suatu senyawa atau agen antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui keefektifan suatu zat terhadap bakteri tertentu baik gram positif maupun gram negatif. Berikut merupakan metode yang biasanya digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri:

1. Difusi Cakram

Sensitivitas bakteri terhadap antibiotik dapat dinilai dengan metode difusi cakram. Prinsip kerja metode ini melibatkan penyebaran senyawa antibakteri dari cakram yang direndam dengan larutan antibakteri ke dalam media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah inkubasi, zona bening di sekitar menunjukkan adanya pengurangan pertumbuhan bakteri. Ukuran diameter area ini diukur untuk menilai keefektifan senyawa antibakteri. Diameter zona hambat setiap antibiotik diinterpretasikan dengan kriteria yang ditentukan oleh *Clinical Standards Institute* (CLSI) dan *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (Sonje et al., 2020).

Hasil uji metode ini bersifat kualitatif yang dikategorikan ke dalam sensitif, intermediet, dan resisten. Difusi cakram memiliki banyak keunggulan yakni hemat biaya, fleksibel, dan memungkinkan pertumbuhan organisme yang dapat dilihat. Keunggulan lainnya adalah metode ini memungkinkan pengujian kepekaan langsung (DST). Sementara kelemahan dari metode ini adalah pengukuran dan dokumentasi

data dilakukan secara manual dan memberikan hasil yang berbeda (Sonje et al., 2020).

2. Difusi Sumuran

Metode ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba yang biasanya ditemukan pada tumbuhan. Prinsip kerja metode difusi sumur ini mirip dengan metode cakram, namun menggunakan sumur yang terbuat dari media agar. Senyawa antimikroba ditambahkan ke dalam sumur, setelah inkubasi difusi senyawa tersebut ke dalam media agar menciptakan zona penghambatan di sekitar sumur. Metode difusi sumur biasa digunakan dalam menentukan MIC media padat. Saat antibiotik berdifusi ke dalam media agarosa, media bening terbentuk di sekitar cawan petri, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Diameter zona bening meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi antibiotik. Metode difusi sumur bersifat kualitatif dan tidak mengukur jumlah senyawa yang terdifusi ke dalam media agar (Sonje et al., 2020).

Metode ini mempunyai kelebihan yaitu lebih mudah dilakukan, lebih ekonomis, lebih sensitif dan lebih praktis dibandingkan metode cakram untuk pengujian senyawa kationik. Metode difusi sumur lebih unggul dibandingkan metode difusi cakram karena sampel yang dimasukkan ke dalam sumur mengalami proses osmosis sehingga lebih efektif dalam mengendalikan bakteri. Kerugian dari metode difusi sumur meliputi perlunya pengujian kualitatif, reproduktivitas yang buruk, dan adanya residu agar yang mengganggu pengujian (Nurul dkk., 2023).

3. Dilusi Cair

Metode pengeceran banyak digunakan di rumah sakit, fasilitas kesehatan masyarakat, virologi, imunologi, mikrobiologi, industri farmasi, proteksi pangan untuk mendeteksi mikroorganisme yang tumbuh dan berkoloni pada media bakteri. Tujuan dari metode ini adalah untuk memperkirakan konsentrasi mikroorganisme, bakteri dan virus dari sampel yang tidak diketahui dengan menghitung dan mengukur jumlah koloni yang di kultur, sehingga mengurangi jumlah bakteri yang terbentuk dalam suspensi. Prinsip dari metode ini adalah mengecerkan sampel uji untuk menghasilkan beberapa konsentrasi pengeceran. Konsentrasi masing-masing sampel uji kemudian ditambahkan pada suspensi bakteri dalam medium (Zaini, 2021).

Metode difusi cair memiliki keuntungan yaitu kontak yang lebih tinggi antara sampel uji dan bakteri karena luas permukaan medium yang lebih besar. cara ini lebih ekonomis dan mudah diterapkan. Kelemahannya adalah adanya rangkaian pengeceran yang membatasi konsentrasi sampel uji yang diperoleh pada konsentrasi tertentu, sehingga efek penghambatan dapat terjadi meskipun pada konsentrasi rendah. Selain itu, terdapat risiko tinggi terjadinya kesalahan distribusi sampel yang mengurangi keakuratan hasil (Nurul dkk., 2023).

4. Dilusi Agar Solid

Metode dilusi padat adalah proses yang dilakukan pada media yang sudah terisi dengan inokulasi bakteri dan antimikroba. Hasil ini dianggap sebagai cara umum yang digunakan untuk menentukan KHM dalam

kombinasi bakteri atau anti mikroba uji. Pengujian kerentanan antibakteri dan anti jamur lebih cocok dengan teknik dilusi agar. Prinsip kerja metode ini melibatkan penggunaan pengeceran tabung untuk menguji KHM yang ditunjukkan dengan pertumbuhan koloni bakteri (Nurul dkk., 2023).

Keunggulan metode dilusi agar adalah efisiensi dalam penggunaan media, adanya replikator inokulum yang tersedia secara komersial yang dapat memindahkan antara 32 – 60 jenis inokula bakteri ke setiap lempeng agar dan berpotensi meningkatkan identifikasi akhir KHM serta memperluas rentang konsentrasi antibiotik. Sementara kelemahan dari metode ini adalah kesulitan dalam memastikan suhu agar tidak berada pada suhu 45 – 50⁰C, titik akhir sering kali sulit untuk dibaca, kemurnian inokulum juga tidak mudah dipastikan, dan jika tidak diotomatisasi metode ini bisa sangat melelahkan serta memerlukan banyak sumber daya ekonomi dan teknis (Nurul dkk., 2023).

E. Mekanisme Senyawa Probiotik Sebagai Antibakteri

Aktivitas antibakteri probiotik dan metabolit sekunder dalam kombucha terutama disebabkan oleh senyawa polifenol dan asam organik yang terbentuk selama fermentasi. Polifenol meliputi flavonoid, tanin, dan senyawa fenolik lainnya yang memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan, termasuk aktivitas antibakteri. Senyawa polifenol bekerja melalui beberapa mekanisme untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Polifenol dapat berinteraksi dengan komponen dinding sel bakteri, terutama bakteri gram positif yang memiliki lapisan peptidoglikan tebal. Interaksi ini dapat merusak dinding sel

yang menyebabkan kebocoran isi sel dan kematian bakteri (Bhattacharya et al., 2018).

Polifenol menghambat enzim yang terlibat dalam sintesis peptidoglikan, sehingga mencegah pembentukan dinding sel baru bakteri. Selain itu, polifenol dapat meningkatkan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam sel bakteri, sehingga menyebabkan stres oksidatif yang merusak komponen penting seperti DNA dan protein. Hal ini mengurangi kemampuan bakteri dalam bertahan hidup dan berkembang biak. Polifenol membuat bakteri lebih rentan terhadap kerusakan oksidatif dengan mengganggu sistem pertahanan antioksidannya. Selama fermentasi, kombucha menghasilkan asam asetat dan asam organik lainnya yang menurunkan pH lingkungan. Senyawa polifenol berperan dalam hal ini dengan menciptakan kondisi asam yang menghambat pertumbuhan banyak bakteri patogen (Bhattacharya et al., 2018).

Di samping senyawa polifenol, selama proses fermentasi terbentuk asam-asam organik pada kombucha. Asam organik yang paling umum diproduksi di kombucha adalah asam asetat. Asam asetat dalam kombucha dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Asam asetat yang terdapat pada kombucha merupakan senyawa yang bekerja paling baik sebagai agen antibakteri. Asam asetat yang terbentuk dalam kombucha terurai dan melepaskan proton bebas, sehingga menurunkan pH medium (Yanti dkk., 2020)

Asam asetat yang tidak terdisosiasi dapat merusak struktur bilayer lipid bakteri dan memasukkan proton ke dalam sitoplasma. Sebagian besar proton intraseluler menyebabkan keadaan asam di sitoplasma, menyebabkan

denaturasi protein dan hilangnya energi. Oleh karena itu, kadar asam asetat yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, asam organik yang terbentuk dalam kombucha menurunkan pH substrat ke nilai yang lebih rendah. pH media kultur yang rendah dapat membuat sitoplasma bakteri menjadi asam dan menyebabkan kerusakan sel yang parah (Yanti dkk., 2020).