

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Karakteristik Serbuk Simplisia Daun Kelor

Daun kelor (*Moringa oleifera L.*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Jagapati, Abiansemal, Badung, Bali. Sebanyak 2000 gram daun kelor segar digunakan sebagai bahan utama dalam pembuatan kombucha. Daun yang digunakan dipilih secara selektif dengan kriteria daun yang masih segar, berwarna hijau merata, tidak layu dan berwarna kuning, tidak memiliki bercak hitam, serta tidak berlubang.

Untuk memastikan kualitas bahan baku, peneliti melakukan pengujian kadar air dan cemaran mikroba. Hasil uji kadar air yang dilakukan menggunakan metode thermogravimetri menunjukkan bahwa kadar air daun kelor sebesar 9,1%. Pengujian ini dilakukan dengan memanaskan sampel dalam oven pada suhu 45⁰C selama 8 jam, hingga diperoleh bobot konstan. Nilai tersebut menunjukkan bahwa daun kelor berada dalam kondisi kering dan layak untuk difermentasi tanpa risiko kontaminasi akibat kelembapan berlebih.

Daun kelor yang telah mengalami proses pengeringan kemudian dihaluskan menjadi serbuk simplisia. Dalam penelitian ini, dari 2000 gram daun kelor segar dikeringkan dan dihaluskan, diperoleh serbuk simplisia sebanyak 270 gram. Selanjutnya, serbuk simplisia tersebut

dimasukkan ke dalam kantong teh dengan takaran 5 gram per kantong, agar lebih praktis dan seragam dalam proses fermentasi.

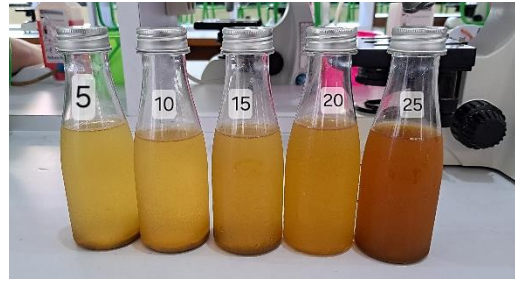
Uji kapang dan khamir dalam penelitian ini menggunakan metode *Pour Plate* pada media *Popato Dextrose Agar* (PDA). Proses inkubasi dilakukan selama 7 hari pada suhu ruang ($\pm 25 - 28^{\circ}\text{C}$). Berdasarkan hasil pengamatan, jumlah koloni kapang dan khamir yang terdeteksi sebesar $1,1 \times 10^3$ koloni/gram. Nilai tersebut masih berada dalam batas aman dan sesuai dengan standar maksimum cemaran mikroba berdasarkan BPOM No. 32 Tahun 2019, sehingga daun kelor dinyatakan layak digunakan sebagai bahan fermentasi kombucha.

2. Karakteristik Kombucha Daun Kelor

Karakteristik awal kombucha daun kelor dalam penelitian ini ditentukan berdasarkan formulasi bahan berupa serbuk daun kelor sebanyak 30 gram serta penambahan madu sebesar 40% dari total volume larutan sebanyak 1500 ml. Proses fermentasi dilakukan pada suhu ruang, yakni berkisar antara $25-30^{\circ}\text{C}$, menggunakan starter kultur berupa SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) berukuran diameter 6 cm yang diperoleh dari *IndoKombucha* kota Bandung, Jawa Barat. Pengamatan karakteristik fisik dan kimia larutan, khususnya warna dan pH, dilakukan pada hari ke-5, 10, 15, 20, dan 25 fermentasi. Setelah proses fermentasi selesai pada masing-masing interval waktu, sampel disimpan pada suhu 4°C .



Gambar 6. Larutan teh daun kelor



Gambar 7. Kombucha daun kelor

Sebelum fermentasi dimulai, larutan tampak berwarna kuning kehijauan muda dan memiliki pH awal dalam kisaran 7,0. Setelah 5 hari fermentasi, warna larutan sedikit menggelap menjadi kuning tua jernih, dan pH menurun ke kisaran 6,0. Pada hari ke-10, warna berubah menjadi kuning jingga pucat, menandakan mulai terbentuknya senyawa hasil metabolisme mikroba, dengan pH berkisar antara 5,0. Fermentasi selama 15 hari menghasilkan larutan berwarna jingga keemasan yang lebih pekat, disertai penurunan pH ke kisaran 5,0. Pada hari ke-20, larutan tampak berwarna coklat muda dengan intensitas warna lebih dalam dan pH turun ke kisaran 4,0. Setelah 25 hari fermentasi, larutan menunjukkan warna coklat tua keruh, mengindikasikan akumulasi senyawa bioaktif dan organik kompleks, serta mencapai pH terendah di kisaran 3,0.

3. Hasil Uji Organoleptik Kombucha Daun Kelor

Uji organoleptik dilakukan dengan menggunakan metode hedonik, yang bertujuan untuk penilaian persepsi sensorik 30 panelis terhadap kombucha daun kelor pada parameter aroma, warna, dan rasa. Hasil uji organoleptik kombucha daun kelor disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2
Hasil Uji Organoleptik Kombucha Daun Kelor

Waktu Fermentasi	Aroma	Warna	Rasa	Rerata Skor Organoleptik
5 Hari	3,37	3,93	3,96	3,74
10 Hari	3,59	3,41	3,81	3,61
15 Hari	3,11	3,59	3,11	3,26
20 Hari	3,44	3,63	3,41	3,49
25 Hari	2,48	3,00	2,00	2,46

Berdasarkan Tabel 2, kombucha daun kelor yang difermentasikan selama 5 hari mendapatkan skor tertinggi sebesar 3,74. Hal ini menunjukkan panelis menyukai produk kombucha daun kelor yang dihasilkan selama proses fermentasi.

4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah difusi cakram (*Kirby Bauer*). Aktivitas antibakteri diukur berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk. Semakin besar diameter zona hambat, maka semakin tinggi aktivitas antibakterinya. Dalam penelitian ini, kontrol positif yang digunakan adalah kombucha teh hijau sedangkan, kontrol negatif digunakan seduhan serbuk simplisia daun kelor. Hasil uji aktivitas antibakteri kombucha daun kelor yang disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3.
Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Kombucha Daun Kelor

Kelompok Perlakuan	Rerata Diameter Zona Hambat (mm) ± SD	Interpretasi Hasil	Kategori
Kontrol negatif	0 ± 0,00	Tidak terbentuk zona hambat	Tidak terdapat efektivitas antibakteri
Kontrol Positif	4,12 ± 0,06	Terbentuk zona hambat	Lemah

5 Hari	$0 \pm 0,00$	Tidak terbentuk zona hambat	Tidak terdapat efektivitas antibakteri
10 Hari	$0 \pm 0,00$	Tidak terbentuk zona hambat	Tidak terdapat efektivitas antibakteri
15 Hari	$1 \pm 0,00$	Terbentuk zona hambat	Lemah
20 Hari	$1,05 \pm 0,06$	Terbentuk zona hambat	Lemah
25 Hari	$1,11 \pm 0,06$	Terbentuk zona hambat	Lemah

Data menunjukkan hasil uji aktivitas berdasarkan diameter zona hambat terhadap variasi waktu fermentasi. Zona hambat tertinggi terdapat pada kontrol positif sebesar $4,12 \pm 0,06$ mm dan waktu fermentasi selama 25 hari $1,11 \pm 0,06$ mm.

5. Analisa Statistik

a. Uji Normalitas

Uji normalitas data dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro Wilk*. Dalam uji ini data dikatakan berdistribusi normal apabila nilai Sig. > 0,05. Sebaliknya jika data < 0,05 menunjukkan bahwa data berdistribusi tidak normal. Hasil uji normalitas disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4
Hasil Uji Normalitas

Kelompok	Statistik	df	Sig.	Interpretasi
Kontrol positif	0,863	4	0,272	Normal
Hari ke-5	0,000	4	0,000	Tidak normal
Hari ke-10	0,000	4	0,000	Tidak normal
Hari ke-15	0,000	4	0,000	Tidak normal
Hari ke-20	0,729	4	0,024	Tidak normal
Hari ke-25	0,895	4	0,406	Normal

Berdasarkan uji normalitas menunjukkan hasil dapat simpulkan data berdistribusi tidak normal karena ($p < 0,05$).

b. Uji Korelasi

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara waktu fermentasi kombucha daun kelor dengan aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus cereus*. Berdasarkan hasil analisis korelasi *Spearman*, diperoleh nilai koefisien korelasi sebesar 0,975 dengan tingkat signifikansi ($p = 0,005$). Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang sangat kuat dan signifikan secara statistik antara waktu fermentasi dan zona hambat. Semakin lama proses fermentasi berlangsung, semakin besar pula diameter zona hambat yang dihasilkan terhadap *Bacillus cereus*.

B. Pembahasan

1. Karakteristik simplisia daun kelor

Pada penelitian ini, Pengeringan daun kelor (*Moringa oleifera* L.) pada suhu 45 °C selama 8 jam bertujuan untuk mempertahankan kualitas senyawa bioaktif tanpa merusak struktur nutrisi utamanya. Suhu moderat ini dinilai ideal karena mampu mengurangi kadar air hingga di bawah 10%, sehingga memperlambat pertumbuhan mikroorganisme dan memperpanjang umur simpan simplisia (Paramita dkk., 2021).

Pada suhu 45 °C, kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, yang berperan sebagai antioksidan alami, tetap stabil. Proses pengeringan ini menghasilkan serbuk berwarna hijau muda dengan

aroma khas daun kelor yang tidak terlalu menyengat, serta tekstur serbuk halus setelah melalui proses pengayakan. Kadar air rendah pada simplisia sangat penting untuk menghindari kontaminasi kapang, khamir, dan bakteri selama penyimpanan. Setelah dilakukan proses pengeringan diperoleh serbuk simplisia sebanyak 270 gram. Jumlah tersebut menunjukkan bahwa adanya penyusutan bobot yang signifikan akibat penguapan air dan hilangnya senyawa volatil selama proses pengolahan (Paramita dkk., 2021).

Uji kapang dan khamir dilakukan untuk memastikan keamanan mikrobiologis simplisia. Metode *pour plate* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) digunakan dengan inkubasi selama 7 hari pada suhu ruang ($\pm 25\text{--}28\text{ }^{\circ}\text{C}$). Metode ini mampu mengidentifikasi cemaran jamur dan khamir secara kuantitatif dan sangat sensitif. Pemeriksaan ini penting karena keberadaan kapang dan khamir dapat menurunkan mutu produk herbal, menyebabkan degradasi senyawa aktif, dan berisiko menghasilkan mikotoksin (Permata dkk., 2024).

2. Karakteristik Kombucha Daun Kelor

Selama proses fermentasi kombucha daun kelor, terjadi perubahan progresif terhadap karakteristik fisik dan kimia larutan yang secara langsung merefleksikan dinamika metabolisme mikroorganisme dalam kultur SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). Salah satu parameter utama yang diamati adalah penurunan nilai pH secara bertahap, yakni dari kisaran awal 6,0 menjadi 3,0 pada hari ke-25 fermentasi. Penurunan ini dihasilkan dari proses fermentatif dua tahap,

yakni konversi gula sederhana dalam madu menjadi etanol oleh khamir (*Saccharomyces cerevisiae*), yang selanjutnya dioksidasi oleh bakteri asam asetat (*Acetobacter xylinum*) menjadi senyawa asam organik seperti asam asetat dan asam glukonat (Kaewkod et al., 2019). Penurunan pH tidak hanya menunjukkan kematangan proses fermentasi, tetapi juga merupakan indikator keamanan mikrobiologis produk. Berdasarkan ketentuan SNI 01-2891-1992 serta regulasi *FDA* (*Food and Drug Administration*, 2009), nilai pH minuman fermentasi seperti kombucha harus berada di bawah 4,2 untuk mencegah pertumbuhan patogen berbahaya seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella*.

Perubahan warna juga menjadi parameter organoleptik penting dalam evaluasi fermentasi kombucha daun kelor. Warna awal larutan yang semula kuning kehijauan perlahan mengalami transformasi menjadi cokelat tua keruh seiring waktu fermentasi. Perubahan ini merepresentasikan peningkatan senyawa bioaktif, terutama senyawa fenolik terkonjugasi, hasil dari aktivitas enzimatis mikroba terhadap substrat daun kelor yang kaya akan flavonoid, tanin, dan senyawa antioksidan lainnya (Cardoso et al., 2020). Warna yang semakin pekat pada hari ke-15 hingga hari ke-25 menandakan akumulasi metabolit sekunder dan reaksi *Maillard* ringan akibat interaksi antara senyawa fenolik dan senyawa gula reduksi. Perubahan ini memperkuat citra sensorik kombucha dan menjadi indikator visual dari kematangan fermentasi. Selain itu, keberadaan madu sebagai sumber karbon turut

mendukung perkembangan mikroba karena kandungan glukosa dan fruktosa yang tinggi serta komponen antibakteri alami seperti hidrogen peroksida dan senyawa polifenol, yang membantu mempertahankan dominasi mikroba fermentatif selama fermentasi (Santos et al., 2024).

Penggunaan SCOBY berdiameter 6 cm dalam fermentasi kombucha daun kelor secara signifikan mempercepat laju fermentasi serta meningkatkan konsistensi produk. Ukuran SCOBY menentukan jumlah komunitas mikroba awal yang terlibat dalam proses fermentatif. SCOBY berdiameter lebih besar mengandung komunitas mikroba dalam jumlah yang lebih tinggi, terutama *Acetobacter* dan *Saccharomyces*, yang mempercepat produksi metabolit seperti asam asetat, etanol, dan senyawa fenolik aktif (D. U. Khasanah & Novika, 2024). Pada suhu ruang (25–30°C), kondisi optimal bagi pertumbuhan mikroorganisme tersebut, terjadi fermentasi yang efisien ditandai dengan penurunan pH lebih cepat serta pembentukan karbonasi alami yang meningkatkan sensasi sensorik (Anantachoke et al., 2023). SCOBY dengan ukuran tersebut juga berperan dalam menjaga kestabilan fermentasi dengan menciptakan lingkungan kompetitif yang menekan mikroba kontaminan dan mempertahankan komunitas probiotik dominan (Rosita dkk., 2021).

Selain mempercepat fermentasi, SCOBY berukuran 6 cm juga memperkuat stabilitas komunitas mikroba. Luas permukaan kontak yang lebih besar memungkinkan proses kolonisasi substrat berjalan lebih merata dan cepat. Hal ini menguntungkan dalam menekan

pertumbuhan mikroorganisme kontaminan yang bersifat oportunistik (Tejedor Calvo & Morales, 2023). Selain itu, SCOBY dengan ukuran optimal menghasilkan kombucha dengan keasaman yang lebih konsisten dan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi. Pernyataan ini juga diperkuat oleh Rosita dkk., (2021), yang menunjukkan bahwa ukuran SCOBY berkorelasi positif dengan stabilitas mikroba probiotik selama fermentasi serta kemampuan menjaga kualitas fisik dan fungsional kombucha secara keseluruhan. Oleh karena itu, keberhasilan fermentasi kombucha daun kelor dalam menghasilkan produk yang aman, fungsional, dan berkualitas tinggi sangat bergantung pada parameter teknis seperti ukuran SCOBY, suhu fermentasi, dan formulasi substrat, yang semuanya harus dikendalikan secara presisi.

3. Uji Organoleptik Kombucha Daun Kelor

Penilaian organoleptik dilakukan untuk menilai persepsi sensorik panelis pada kombucha daun kelor (*Moringa oleifera L.*) yang telah difermentasikan selama 5, 10, 15, 20, dan 25 hari berdasarkan parameter warna, aroma, dan rasa. Penilaian ini melibatkan 30 panelis dengan menggunakan metode hedonik, yang merupakan penilaian subyektif untuk mengevaluasi tingkat kesukaan konsumen terhadap kualitas sensorik suatu produk pangan (Kumalasari & Larasati, 2023). Metode ini dipilih karena sederhana, mudah dilakukan, dan dapat memberikan gambaran nyata mengenai preferensi panelis terhadap variasi fermentasi kombucha daun kelor (Ermawan & Fadhillah, 2023). Selain itu, uji ini sering digunakan dalam penelitian minuman

fermentasi, dikarenakan secara langsung dapat mencerminkan penilaian sensorik dari panelis yang mewakili calon konsumen (Kumalasari & Larasati, 2023).

Pelaksanaan uji ini mengacu pada SNI 01-2891-1992 dan SNI ISO 6658:2017, yang memberikan pedoman umum dalam analisis sensori, seperti pemilihan panelis, parameter pengujian, dan kondisi ruang uji. Kedua standar tersebut memastikan bahwa penilaian dilakukan secara sistematis, terstandar, dan dapat menghasilkan data yang valid serta dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah. Dukungan terhadap metode ini juga ditemukan dalam penelitian oleh Mardiana et al., (2022) yang menunjukkan bahwa uji hedonik efektif dalam mengevaluasi kombucha herbal berdasarkan tingkat kesukaan panelis terhadap karakteristik warna, aroma, dan rasa.

Hasil uji organoleptik menunjukkan bahwa fermentasi kombucha daun kelor selama 5 hari paling disukai oleh panelis dengan rerata skor sebesar 3,74. Pada parameter warna, nilai tertinggi diperoleh pada fermentasi hari ke-5. Warna kombucha pada waktu ini tampak paling cerah, bening dan menarik secara visual, dengan warna kekuningan seperti teh muda. Seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi, terjadi perubahan warna yang semakin gelap, hingga menjadi coklat tua dan keruh pada hari ke-25, yang mendapatkan rerata skor organoleptik terendah sebesar 2,46. Warna pada fermentasi, ini kurang disukai oleh panelis karena dianggap tidak menarik. Perubahan warna ini disebabkan oleh reaksi oksidasi senyawa fenolik, yang

merupakan proses degradasi senyawa antioksidan alami akibat paparan oksigen selama fermentasi (Mfopa et al., 2024).

Senyawa fenolik mengalami polimerisasi dan pembentukan kompleks berwarna gelap. Selain itu, terbentuk pula melanoidin, yakni pigmen berwarna coklat tua hasil dari reaksi non-enzimatik antara gula dan asam amino. Reaksi ini dikenal sebagai reaksi *Maillard*, yang menghasilkan senyawa kompleks penyumbang warna dan cita rasa khas. Dalam penelitian ini, proses tersebut diperkuat oleh adanya madu yang berfungsi sebagai sumber gula tambahan, sehingga mempercepat reaksi *Maillard* selama fermentasi berlangsung dan menyebabkan warna kombucha menjadi lebih gelap seiring lamanya waktu fermentasi (Santos et al., 2024). Selain itu, kondisi pH yang rendah juga mempercepat reaksi *Maillard* dan oksidasi, yang memperparah penurunan kualitas visual minuman. Perubahan ini tidak hanya berdampak pada estetika, tetapi juga menjadi indikator perubahan senyawa aktif yang memengaruhi kualitas sensorik secara keseluruhan (Sintyadewi & Widnyani, 2021).

Parameter rasa menunjukkan bahwa fermentasi kombucha daun kelor selama 5 hari menghasilkan skor tertinggi, yakni sebesar 3,74. Pada hari ke-5, kombucha memiliki keseimbangan cita rasa yang ideal antara manis dari madu dan sedikit asam hasil awal fermentasi, sehingga dinilai paling enak dan mudah diterima secara organoleptik oleh panelis. Rasa terbaik masih terdeteksi hingga hari ke-10 dengan rerata skor 3,61, namun mulai menurun signifikan pada hari ke-15 dan 20, serta mencapai

titik terendah pada hari ke-25 dengan skor 2,46. Penurunan nilai rasa ini erat kaitannya dengan peningkatan keasaman akibat akumulasi asam organik seperti asam asetat, asam laktat, dan asam glukonat yang terbentuk selama proses fermentasi berlangsung. Selain memengaruhi persepsi rasa, penurunan pH selama fermentasi yang mencapai angka 3 juga berdampak terhadap perubahan warna kombucha. pH rendah menyebabkan ketidakstabilan senyawa pigmen, sehingga mempercepat proses degradasi dan polimerisasi fenol menjadi senyawa berwarna gelap seperti melanoidin (Kitwetcharoen et al., 2023). Kombucha yang semula berwarna cerah dan menarik berubah menjadi coklat tua dan keruh, yang secara visual dinilai kurang menarik oleh panelis. Di sisi lain, dominasi rasa asam yang muncul pada pH rendah turut menutupi karakter manis alami dari madu, sehingga menurunkan kenikmatan sensorik secara keseluruhan. (Sintyadewi & Widnyani, 2021).

Parameter aroma menunjukkan bahwa fermentasi 10 hari memperoleh nilai tertinggi, meskipun tidak terlalu jauh dari fermentasi 5 hari sebesar 3,59, dengan skor rerata organoleptik yang mendekati 3,61. Aroma kombucha pada fermentasi hari ke-10 dinilai paling disukai oleh panelis karena menghasilkan aroma khas kombucha yang segar dan ringan, yang berasal dari senyawa volatil seperti alkohol, ester, dan aldehida yang terbentuk selama fase pertumbuhan aktif mikroorganisme (Sintyadewi & Widnyani, 2021). Penambahan madu juga turut memperkaya karakteristik aroma dengan memberikan nuansa manis alami yang khas, sehingga menambah kompleksitas aroma kombucha.

Akan tetapi, seiring bertambahnya waktu fermentasi, terjadi akumulasi senyawa asam volatil seperti asam asetat yang menyebabkan aroma menjadi menyengat dan kurang disukai, sebagaimana tercermin pada fermentasi hari ke-25 yang hanya memperoleh skor 2,40 (Santos et al., 2024). Penurunan pH hingga mencapai angka 3 turut memperparah kondisi tersebut, karena tingkat keasaman yang tinggi meningkatkan volatilitas senyawa asam, yang pada akhirnya menciptakan aroma tajam dan menusuk. Kondisi ini menunjukkan bahwa perubahan aroma sangat dipengaruhi oleh aktivitas mikroorganisme selama fermentasi serta oleh tingkat keasaman yang semakin tinggi, sehingga pH menjadi salah satu faktor krusial yang memengaruhi kualitas aroma, warna, dan rasa kombucha daun kelor secara keseluruhan (Ivanisova et al., 2020).

Secara keseluruhan, fermentasi kombucha daun kelor dengan penambahan madu, selama 5 hari memberikan kualitas organoleptik terbaik, dengan aroma yang cukup baik, warna yang cerah, dan rasa yang paling disukai. Kondisi ini merepresentasikan fase awal fermentasi yang belum menghasilkan keasaman tinggi, tetapi cukup aktif untuk menghasilkan senyawa volatil dan cita rasa khas kombucha. Selain itu, madu sebagai bahan tambahan tidak hanya berperan sebagai sumber karbon bagi mikroorganisme fermentatif, tetapi juga memberikan kontribusi terhadap karakteristik warna dan rasa. Kehadiran madu memperkaya rasa manis alami yang menyeimbangkan keasaman, sekaligus membantu menjaga kestabilan warna pada tahap awal fermentasi (Santos et al., 2024).

Hasil penelitian ini, sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Amarasinghe et al. (2018) yang menyatakan bahwa waktu fermentasi antara 5 hingga 10 hari merupakan fase optimal dalam produksi kombucha untuk menghasilkan karakteristik sensorik terbaik. Dengan demikian, waktu fermentasi berperan penting dalam menentukan kualitas sensori kombucha daun kelor, yang turut berpengaruh pada tingkat penerimaan konsumen terhadap produk tersebut.

4. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion*), yaitu metode yang umum digunakan untuk mengevaluasi sensitivitas bakteri terhadap senyawa antimikroba. Metode ini mengukur diameter zona hambat di sekitar kertas cakram yang telah ditetesi sampel, sebagai indikator efektivitas senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri target (Sonje et al., 2020). Media yang digunakan untuk pengujian adalah *Blood Agar Plate* (BAP), yaitu media pertumbuhan yang diperkaya dengan darah domba untuk mendukung pertumbuhan bakteri yang membutuhkan faktor-faktor nutrisi tambahan dan untuk mendeteksi aktivitas hemolitik. BAP sangat sesuai digunakan untuk identifikasi dan pengamatan pertumbuhan bakteri Gram positif seperti *Bacillus cereus* (Mills et al., 2022).

Proses inkubasi dilakukan dalam kondisi anaerob parsial menggunakan *candle jar*, yaitu metode di mana beberapa lilin dinyalakan dalam wadah tertutup untuk mengurangi kadar oksigen dan

meningkatkan kadar karbon dioksida. Lingkungan ini menciptakan kondisi yang mendukung pertumbuhan optimal bagi mikroorganisme anaerob fakultatif maupun mikroaerofilik seperti *Bacillus cereus*. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam, yang merupakan suhu optimal untuk pertumbuhan *Bacillus cereus*, agar pengamatan terhadap aktivitas antibakteri kombucha menjadi lebih representatif (Prejish et al., 2024).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa zona hambat terhadap *Bacillus cereus* mulai terbentuk pada hari ke-15 fermentasi sebesar 1 mm $\pm$ 0,00 dan sedikit meningkat hingga hari ke-25 menjadi 1,11 mm $\pm$ 0,06. Menurut klasifikasi standar, nilai ini tergolong dalam kategori hambat lemah (< 5 mm). Peningkatan zona hambat ini seiring waktu fermentasi diduga disebabkan oleh akumulasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme dalam kultur starter SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*), seperti *Acetobacter* dan *Saccharomyces* (Kitwetcharoen et al., 2023). Mikroorganisme tersebut mengubah gula menjadi berbagai senyawa antimikroba seperti asam asetat, etanol, dan asam glukonat, yang bekerja sinergis dengan senyawa aktif alami daun kelor seperti flavonoid, tanin, alkaloid, dan saponin. Beberapa senyawa fenolik spesifik teridentifikasi dalam daun kelor antara lain asam galat, asam ferulat, dan *quercetin*. Senyawa ini memiliki mekanisme kerja antimikroba seperti penghambat enzim, kerusakan membran sel, dan gangguan metabolisme DNA bakteri (Selmi et al., 2025).

Selain kontribusi daun kelor, penambahan madu sebagai sumber karbon tambahan juga berperan penting dalam mendukung aktivitas antibakteri kombucha. Madu dikenal mengandung senyawa antibakteri alami seperti hidrogen peroksida, flavonoid, dan asam fenolat (Santos et al., 2024). Senyawa-senyawa ini memiliki kemampuan untuk merusak dinding sel bakteri, menghambat aktivitas enzim, serta meningkatkan permeabilitas membran sel. Selain itu, madu mendukung pertumbuhan mikroorganisme probiotik dalam kultur SCOBY, yang kemudian dapat menghasilkan metabolit sekunder tambahan dengan potensi antibakteri (Putri dkk., 2023). Kandungan gula dalam madu juga memberikan substrat yang cukup untuk fermentasi, meningkatkan produksi asam organik dan senyawa fenolik selama proses fermentasi (Kusumiyati dkk., 2022).

Selama fermentasi, terjadi penurunan pH sebagai akibat akumulasi asam organik. Kondisi asam ini mendukung penghambatan pertumbuhan bakteri patogen, namun bila pH terlalu rendah, kestabilan senyawa fenolik tertentu dapat menurun. Seperti, asam galat dan *quercetin* yang dapat mengalami degradasi pada lingkungan terlalu asam, yang dapat menurunkan aktivitas antimikroba kombucha. Oleh karena itu, pengaturan durasi fermentasi yang optimal penting untuk menjaga keseimbangan antara produksi senyawa antimikroba dan kestabilannya (Tejedor Calvo & Morales, 2023).

Mutu bahan baku juga turut mempengaruhi efektivitas antibakteri. Serbuk daun kelor yang digunakan memiliki kadar air

rendah sebesar 9,1% yang mendukung kestabilan penyimpanan karena menghambat pertumbuhan mikroorganisme perusak (Hasnelly dkk., 2018). Namun, hasil uji kapang dan khamir menunjukkan keberadaan mikroorganisme sebesar $1,1 \times 10^3$ koloni/gram, yang masih dalam batas normal aman, meskipun keberadaan mikroorganisme alami ini berpotensi mempengaruhi dominasi mikroba fermentasi dan kestabilan inokulum (BPOM RI, 2019).

Efektivitas kombucha daun kelor dibandingkan dengan kontrol positif menggunakan kombucha teh hijau menunjukkan hasil yang signifikan. Kombucha teh hijau menghasilkan zona hambat sebesar $4,12 \text{ mm} \pm 0,06$. Teh hijau mengandung katekin dalam jumlah tinggi, terutama *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epicatechin gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC), yang bersifat antibakteri kuat. EGCG diketahui dapat menyebabkan lisis sel bakteri melalui kerusakan dinding dan membran sel serta penghambatan aktivitas enzim esensial. Kombinasi katekin dengan asam organik dari fermentasi memperkuat daya hambat, menjadikan teh hijau sebagai bahan fermentasi yang lebih unggul dalam menghasilkan kombucha dengan aktivitas antibakteri tinggi (Kitwetcharoen et al., 2023).

Karakteristik *Bacillus cereus* sebagai bakteri gram positif turut mempersulit terbentuknya zona hambat. *Bacillus cereus* memiliki dinding sel tebal dan kemampuan membentuk spora dengan lapisan eksosporium yang tahan terhadap berbagai tekanan lingkungan dan senyawa antimikroba (Candela et al., 2011). Toleransi tinggi terhadap

senyawa fenolik seperti *thymoquinone*, asam galat, dan *quercetin* juga membuat efektivitas hambatan menjadi lebih rendah kecuali jika dikombinasikan dengan senyawa lain atau dalam konsentrasi tinggi (S. Wang et al., 2021).

Untuk mempertahankan potensi senyawa antibakteri pasca fermentasi, kombucha disimpan pada suhu 4⁰C. Penyimpanan dingin terbukti menjaga stabilitas senyawa bioaktif, termasuk fenolik dan asam organik dengan efektivitas antibakteri yang bertahan hingga dua minggu. Kondisi ini penting agar hasil fermentasi tidak mengalami penurunan aktivitas sebelum dilakukan pengujian (Tan et al., 2020).

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri kombucha daun kelor terhadap *Bacillus cereus* tergolong lemah, walaupun terdapat peningkatan selama fermentasi. Kelemahan ini tidak semata berasal dari metode pengujian, melainkan lebih pada keterbatasan konsentrasi dan efektivitas senyawa aktif daun kelor itu sendiri. Namun, penambahan madu berpotensi memberikan kontribusi positif terhadap peningkatan aktivitas antibakteri melalui penyediaan senyawa bioaktif dan peningkatan substrat fermentasi.

Peningkatan aktivitas antibakteri selama fermentasi tidak secara langsung berbanding lurus dengan preferensi organoleptik. Kombucha yang difermentasi selama 15, 20, dan 25 hari menunjukkan zona hambat masing-masing sebesar 1,00 mm, 1,05 mm, dan 1,11 mm, dengan kategori lemah. Sebaliknya, skor organoleptik pada ketiga waktu fermentasi tersebut mengalami penurunan, dengan nilai terendah

tercatat pada hari ke-25 (2,46). Adapun fermentasi selama 5 dan 10 hari yang tidak menunjukkan aktivitas antibakteri cenderung memperoleh skor organoleptik tertinggi, yakni masing-masing sebesar 3,74 dan 3,61. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya kebutuhan akan penyeimbangan antara efektivitas fungsional dan penerimaan sensori. Oleh karena itu, optimasi waktu fermentasi menjadi hal yang krusial untuk mencapai keseimbangan antara kedua aspek tersebut. Berdasarkan data yang diperoleh, fermentasi selama 10 hingga 15 hari dapat dipertimbangkan sebagai titik tengah yang ideal. Selain itu, formulasi produk juga dapat ditingkatkan melalui penambahan perisa alami, seperti jahe, lemon, kayu manis, atau buah-buahan, guna meningkatkan aroma dan rasa tanpa mengganggu kestabilan senyawa bioaktif yang berperan dalam aktivitas antibakteri.

5. Analisa data

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji hubungan antara waktu fermentasi kombucha daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dengan aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus cereus*. Aktivitas ini diukur berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing sampel setelah fermentasi selama 5, 10, 15, 20, dan 25 hari, serta dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Uji normalitas yang dilakukan menggunakan metode *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa sebagian besar data tidak berdistribusi normal, terutama pada kelompok hari ke-20 yang memiliki nilai signifikansi sebesar 0,024. Oleh karena itu, dipilih uji non-

parametrik dalam analisis lanjutan untuk menyesuaikan karakteristik distribusi data.

Pada penelitian ini dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan antara waktu fermentasi dan zona hambat *Bacillus cereus*. Hasil uji menunjukkan adanya korelasi positif yang sangat kuat dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,975 dan signifikansi 0,005. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin lama waktu fermentasi kombucha daun kelor, semakin besar pula aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian, Vohra et al. (2019) yang menyatakan bahwa akumulasi senyawa fenolik dan asam organik selama fermentasi meningkatkan daya hambat mikroba secara signifikan.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara waktu fermentasi dan aktivitas antibakteri kombucha daun kelor terhadap *Bacillus cereus*. Semakin lama waktu fermentasi, semakin tinggi daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri uji. Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Valiyan et al. (2021) menyatakan bahwa aktivitas antibakteri minuman fermentasi meningkat seiring waktu akibat akumulasi senyawa metabolit sekunder.

C. Kelemahan Penelitian

Kelemahan dari penelitian ini meliputi:

1. Penelitian ini tidak melakukan analisis kuantitatif terhadap kadar total asam menggunakan metode titrasi atau kromatografi, sehingga konsentrasi spesifik asam organik yang berperan dalam aktivitas antibakteri tidak dapat diketahui secara pasti. Oleh karena itu,

diperlukan penelitian lanjutan yang mencakup analisis asam organik secara menyeluruh.

2. Penelitian ini tidak mengukur kadar alkohol (etanol) yang mungkin terbentuk selama proses fermentasi, sehingga kontribusi etanol terhadap aktivitas antibakteri dan aspek keamanan produk belum dapat dievaluasi secara objektif.
3. Penelitian ini tidak mengukur kadar total polifenol menggunakan metode spektrofotometri, sehingga kontribusi senyawa polifenol terhadap aktivitas antibakteri hanya diasumsikan berdasarkan literatur. Oleh sebab itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan yang menyertakan analisis kandungan polifenol secara empiris.