

Kinetika fermentasi pada teh kombucha dengan variasi jenis teh berdasarkan pengolahannya

Fermentation kinetics in kombucha tea with tea kind variation based on its processing

MINANG ARDHENIATI, M.A.M. ANDRIANI, BAMBANG SIGIT AMANTO

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 22 Oktober 2008. Revisi disetujui: 3 Februari 2009.

Abstract. Ardheniati M, Andriani MAM, Amanto BS. 2009. Fermentation kinetics in kombucha tea with tea kind variation based on its processing. *Biofarmasi* 7: 48-55. Tea (*Camellia sinensis*) is one of agriculture commodities which contains powerful substance, especially in health sector. The kinds of tea in Indonesia are green tea and black tea. Kombucha tea is made from water and tea boiled with fermentation process about 8-12 days. It consists of complex material changed by *Acetobacter xylinum* bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* leavened. The purpose of the research was to find out the impact of the kinds of tea toward kombucha tea fermentation kinetics with the parameter of specific growth pace (μ), cell growth result (Y_x/s), product formation (Y_p/s), generation time (td), and the amount of multiplication (N). This research was done in UPT Central Laboratory of MIPA Faculty, Sebelas Maret University, Surakarta. The fermentation process optimization was done with the amount of inoculum of 10% (v/v), the temperature of 30°C and the initial sugar content of 10% (b/v). The analysis toward sugar content reduction, acetate acid content, pH value, and kombucha tea microbiology was done about 8 days of fermentation with 24 hours interval. The data generated were treated by a descriptive analysis and t-test investigation, so that the difference of fermentation kinetics between green kombucha tea and black kombucha tea could be found. The results of the research showed that the fermentation kinetic of green kombucha tea had an aerobe and anaerobe specific growth pace of 0.055/hour and 0.015/hour, respectively, cell growth result 1.901×10^7 cfu/mg, product formation 0.064, the efficiency of acetic acid production toward sugar reduction 11.814%, the generation time in aerobe and anaerobe condition 12.6 and 46.2 hours, respectively, and the amount of multiple of 3.583 times. Meanwhile, the fermentation kinetic of black kombucha tea showed an aerobe and anaerobe specific growth pace of 0.054/hour and 0.018/hours, respectively, cell growth result 2.425×10^7 cfu/mg, product formation 0.081, the efficiency of acetic acid production toward sugar reduction 11.510%, the generation time in aerobe and anaerobe condition 12.8 hours and 38.5 hours, respectively, and the amount of multiple 3.583 times. From t-test investigation, it was found that the aerobe specific growth pace, the efficiency of acetic acid production toward sugar reduction, the aerobe generation time, the cell growth, and the product formation were not significantly different. Meanwhile, the anaerobe specific growth pace, the anaerobe generation time, and the amount of multiple were significantly different.

Keywords: Black tea, fermentation kinetic, green tea, kombucha tea

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang saat ini dikenal sebagai salah satu negara penghasil teh yang cukup besar dengan jumlah penduduk yang hampir 80% sebagai petani. Dalam bidang pertanian, Indonesia mampu menghasilkan berbagai macam komoditas pertanian, salah satunya adalah teh (*Camellia sinensis*). Teh diperoleh dari pengolahan daun teh yang merupakan anggota dari Famili Teaceae (Nazaruddin dan Paimin 1993).

Hampir seluruh penduduk dunia mengenal teh. Teh sudah menjadi komoditas dunia, oleh karenanya banyak negara yang berusaha mendapatkannya. Jenis-jenis teh pada dasarnya hanya terdiri dari tiga kelompok utama, yaitu *Black Tea* (teh hitam), *Oolong Tea* (teh oolong), dan *Green Tea* (teh hijau). Teh oolong adalah teh yang diproses secara semifermentasi. Daun teh dilayukan lebih dahulu, kemudian dipanaskan pada suhu 160-240°C selama 3-7 menit untuk inaktivasi enzim, selanjutnya digulung dan dikeringkan. Teh disukai karena mempunyai banyak manfaat, selain berguna sebagai minuman penyegar tubuh,

teh juga berkhasiat mencegah kanker, meningkatkan daya tahan tubuh dari serangan bakteri, kaya akan vitamin C dan vitamin B, serta dapat mengurangi gangguan kekejangan pada anak-anak. Selain itu, konon teh dapat memperpanjang umur (Nazaruddin dan Paimin 1993). Khasiat utama teh berasal dari senyawa polifenol yang dikandungnya.

Dalam rangka memenuhi kebutuhan pangan dan kesehatan masyarakat, perlu adanya usaha-usaha pemanfaatan sumber daya pangan secara optimal. Salah satu cara untuk meningkatkan keanekaragaman hasil olahan teh adalah dengan membuat minuman teh secara fermentasi yang dikenal dengan nama "*Kombucha Tea*" (teh kombucha).

Teh kombucha merupakan minuman fungsional yang menempati posisi di antara minuman konvensional dan obat, sehingga dapat digunakan dalam pencegahan suatu penyakit. Minuman fungsional merupakan minuman yang dirancang secara khusus dengan memanfaatkan senyawa bioaktif tertentu yang berperan dalam mencegah penyakit (Hartoyo 2003). Produk minuman fungsional ini

merupakan hasil fermentasi larutan teh manis dengan menggunakan *starter* mikrobial kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir yang merupakan organisme tingkat rendah) dan difermentasi selama 8-12 hari yang biasa dikenal dengan “jamur kombu” atau “Jamur dipo” (Paimin 2001). Dalam istilah asing, “jamur kombu” disebut dengan *scoby* (*symbiotic colon of bacteria yeast*). “Jamur” tersebut akan tumbuh secara terus-menerus sehingga membentuk susunan berlapis-lapis mengikuti tempat pembiakannya.

Saat proses fermentasi teh kombucha, bakteri akan mengubah glukosa menjadi berbagai jenis asam, vitamin, dan alkohol yang berkhasiat bagi tubuh. Glukosa tersebut berasal dari inversi sukrosa oleh khamir menghasilkan glukosa dan fruktosa. Pada pembuatan etanol oleh khamir dan selulosa oleh *Acetobacter xylinum*, glukosa dikonversi menjadi asam glukonat melalui jalur fosfat pentosa oleh bakteri asam asetat, sedangkan sebagian besar fruktosa dimetabolisme menjadi asam asetat dan sejumlah kecil asam glukonat. Glukosa dalam proses tersebut berperan sebagai substrat untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produk (asam asetat).

Jenis teh, seperti teh hijau dan teh hitam, dihasilkan dengan pengolahan yang berbeda, sehingga kandungan teh juga berbeda. Senyawa yang terkandung dalam teh kombucha mempunyai pengaruh terhadap pertumbuhan sel, pembentukan produk, kadar glukosa, dan pH teh kombucha. Hal ini digambarkan dalam kinetika fermentasi teh kombucha. Perlakuan variasi jenis teh diduga memiliki kinetika fermentasi teh kombucha yang berbeda, sehingga perlu dilakukan penelitian.

Tujuan dari penelitian ini adalah: (i) Mengetahui kinetika fermentasi teh kombucha dengan perilaku kinetika fermentasi, antara lain kecepatan pertumbuhan spesifik (μ), hasil pertumbuhan konstan (Y_x/s), pembentukan produk (Y_p/s), waktu penggandaan (t_d), banyaknya penggandaan/derajat multiplikasi (N), dan efisiensi pembentukan asam asetat; (ii) Mengetahui pengaruh kecepatan pertumbuhan sel dengan kecepatan pembentukan produk dari teh kombucha dengan variasi jenis teh berdasarkan pengolahannya.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di UPT Laboratorium Pusat MIPA Sub Laboratorium Biologi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta selama bulan Maret-Agustus 2008.

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur murni *Acetobacter xylinum* dan *Saccharomyces cerevisiae* yang diperoleh dari Fakultas Teknologi Pertanian UGM Yogyakarta, gula pasir (merek ‘Gulaku’), teh hitam dan teh hijau (Cap Tong Tji), air, akuades, reagen Nelson, reagen Arsenomolibdat, media NA (*Nutrient Agar*), NaOH 0,1 N, dan fenolftalein 1%.

Sementara itu, alat yang digunakan adalah spektrofotometer, saringan teh, timbangan analitik,

autoklaf, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kuvet, penjepit, karet gelang, kapas, termometer, petridish, labu ukur, buret, gelas ukur, inkubator, oven, dan erlenmeyer.

Metode penelitian

Kadar gula reduksi diukur dengan metode Nelson Somogyi (Sudarmadji et al. 1984). Penetapan kadar total asam dihitung sebagai asam asetat dengan metode titrasi (Ranggana 1997). Pengukuran pH dilakukan dengan pH-meter dengan larutan penyangga (*buffer*) pH=7 (Apriyantono 1988). Analisis mikrobiologis dilakukan dengan menghitung jumlah sel dengan metode hitungan cawan (*pour plate*) menggunakan media NA (*Nutrient Agar*) (Roberts dan Smith 1961). Perlakuan variasi jenis teh pada penelitian ini diulang sebanyak tiga kali ulangan analisis untuk mendapatkan data yang valid.

Cara kerja

Pembuatan teh kombucha menggunakan air 1000 ml, teh seduhan sebanyak 8 g, gula pasir sebanyak 10% dari air seduhan (100 g), dan *starter* 10% (100 ml). Tahapan kerja mencakup pembuatan *starter*, pembuatan teh kombucha, penentuan kadar gula reduksi sampel, pembuatan kurva standar, pembuatan medium, dan penanaman sampel. Analisis mikrobiologis dilakukan dengan menghitung jumlah sel dengan metode *pour plate* menggunakan media NA (*Nutrient Agar*). Sementara itu, penentuan total asam sebagai asam asetat dilakukan dengan titrasi seperti yang ditunjukkan oleh Ranggana (1997).

Jumlah koloni dihitung dengan ketentuan jumlah koloni memenuhi kriteria yaitu sebagai berikut: (i) Jumlah koloni berkisar antara 30-300, jika tidak terdapat koloni maka dipilih jumlah koloni yang mendekati. (ii) Tidak terdapat koloni yang menutupi lebih dari separuh permukaan (*spreader*). Perbandingan jumlah koloni suatu pengenceran dengan sebelumnya jika tidak lebih besar dari 2 maka jumlahnya dirata-rata, sebaliknya jika jumlahnya lebih besar dari 2 maka dipakai jumlah koloni pada pengenceran sebelumnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang dikemukakan berikut ini mencakup parameter kinetika fermentasi pada teh kombucha hijau dan teh kombucha hitam.

Kadar gula reduksi

Mikroorganisme membutuhkan energi untuk kelangsungan hidupnya. Energi diperlukan untuk mempertahankan kehidupan sel, perkembangbiakan sel, serta pergerakan organisme yang bersifat motil. Substrat yang paling mudah digunakan adalah gula reduksi. Glukosa dan fruktosa adalah gula reduksi yang digunakan sebagai sumber karbon oleh bakteri asam asetat. Sukrosa bersifat non reduksi karena sukrosa tidak mempunyai gugus OH yang bersifat reaktif, dimana keduanya saling mengikat, sehingga sukrosa akan mengalami inverse terlebih dahulu menjadi glukosa dan fruktosa, dengan demikian jalur metabolismenya menjadi lebih panjang. Enzim invertase

tersebut bekerja optimum pada suhu 37-52°C dan pH berkisar antara 4-5,25. Kadar gula reduksi pada teh kombucha hitam dan teh kombucha hijau ditampilkan pada Gambar 1.

Gambar 1 memperlihatkan bahwa pada awal fermentasi selama 2 hari, kadar gula reduksi semakin meningkat. Kenaikan gula reduksi disebabkan oleh hidrolisis sukrosa menjadi glukosa oleh enzim invertase. Hidrolisis terjadi karena pH media sangat rendah dimana pada kondisi pH tersebut, sukrosa mudah dihidrolisis oleh enzim invertase (Apriyantono 1988). Semakin lama proses fermentasi (setelah 2 hari), kadar gula reduksi semakin menurun. Dari Gambar 1 terlihat pada hari ke-2 sampai hari ke-8, kadar gula reduksi pada teh hitam menurun dari 113,0 mg/ml menjadi 16,5 mg/ml, sedangkan pada teh hijau dari 135,0 mg/ml menjadi 18,0 mg/ml. Menurut Rahayu dan Kuswanto (1987), kadar gula reduksi semakin menurun dikarenakan khamir (*S. cerevisiae*) menguraikan glukosa menjadi alkohol, sehingga kadar alkohol teh kombucha semakin meningkat. Penggunaan gula oleh khamir dapat berlangsung melalui membran sel, baik secara langsung atau dihidrolisis terlebih dahulu, baru kemudian hasil hidrolisis masuk ke dalam sel. Dalam penelitian ini, gula yang digunakan adalah sukrosa (gula pasir merek "Gulaku").

Kadar gula reduksi tertinggi dari kedua jenis teh yang digunakan terjadi pada fermentasi 2 hari pertama yaitu sebesar 113,0 mg/ml untuk teh hitam dan 135,0 mg/ml untuk teh hijau. Pada teh kombucha hijau, kadar gula reduksinya lebih tinggi daripada teh hitam, hal ini disebabkan teh hijau merupakan jenis *unfermented tea*. Tingginya kadar gula pada teh kombucha hijau disebabkan karena perbedaan suhu pelayuan pada saat pengolahan pucuk teh. Menurut Setiawati dan Nasikun (1991), pada pengolahan teh hijau harus dihindarkan terjadinya fermentasi dengan cara pelayuan. Pelayuan dilakukan dengan memanaskan segera daun teh pada suhu tinggi agar enzim-enzim berada dalam kondisi inaktif.

Pelayuan pada suhu tinggi (80-100°C) tersebut menyebabkan berkurangnya kandungan pati dan gum yang disertai dengan naiknya kandungan gula. Pati dan polisakarida yang lain mengalami hidrolisis menjadi gula, sehingga kombucha dari teh hijau memiliki kadar gula reduksi yang tinggi. Pada proses sakarifikasi, terjadi proses pemecahan pati menjadi glukosa dan maltosa melalui reaksi hidrolisis asam. Gula sederhana yang terbentuk kemudian diubah oleh sel khamir menjadi alkohol dalam kondisi anaerob.

Proses fermentasi menyebabkan kandungan polifenol menurun akibat ikut teroksidasi. Perbedaan perlakuan pada pengolahan teh juga menyebabkan perbedaan jumlah senyawa (Zhang et al. 1997). Dengan demikian, kandungan gula yang rendah terdapat pada teh yang mengalami proses fermentasi (teh hitam). Menurut hasil riset Pusat Penelitian Teh dan Kina, Bandung dalam *Indonesian Food and Beverage*, dalam 100 g teh hitam mengandung gula sebesar 32,1 g, sedangkan pada teh hijau sebesar 35,2 g.

Jumlah sel mikrobia

Fermentasi kombucha melibatkan beberapa mikroorganisme yang bekerja secara simbiotik. Mikrobia yang mendominasi dalam fermentasi kombucha yaitu bakteri *A. xilynum* dan khamir *S. cerevisiae*. Selama proses fermentasi berlangsung, khamir akan merombak gula (sukrosa) dalam medium menjadi alkohol yang dilanjutkan dengan oksidasi alkohol menjadi asam asetat oleh bakteri *A. xilynum*. Khamir bersifat fakultatif anaerob, artinya ada atau tidak ada oksigen, khamir tetap dapat tumbuh, sedangkan bakteri asam asetat merupakan mikrobia yang bersifat obligat aerob, artinya bakteri tersebut hanya tumbuh apabila tersedia oksigen. Jumlah sel mikrobia pada teh kombucha hitam dan teh kombucha hijau ditampilkan pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa jumlah mikroorganisme mengalami kenaikan dari jumlah awal yang dimasukkan ke dalam media fermentasi masing-masing mencapai $1,85 \times 10^9$ cfu/ml pada teh hijau dan $1,68 \times 10^9$ cfu/ml pada teh hitam (pada hari ke-5), sedangkan mulai hari ke-6 sampai hari ke-8, baik teh hijau maupun teh hitam, mengalami penurunan jumlah sel mikrobia menjadi $6,50 \times 10^8$ cfu/ml dan $4,20 \times 10^8$ cfu/ml. Peningkatan jumlah sel pada hari pertama disebabkan adanya gula reduksi sebagai substrat yang masih cukup banyak (87 mg/ml pada teh hitam dan 116 mg/ml pada teh hijau). Kenaikan jumlah sel mikrobia menunjukkan gula reduksi hasil sakarifikasi dapat digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan sel dan produksi alkohol. Selain itu, pertumbuhan sel mikrobia juga dipengaruhi oleh suhu, pH, sumber karbon, serta air bebas (aw). Khamir bersifat fakultatif anaerob, artinya ada atau tidak adanya oksigen, khamir tetap dapat tumbuh, sedangkan bakteri asam asetat bersifat aerob. Dalam fermentasi ini, *yeast* dan bakteri termasuk mikroba mesofil (20-40°C).

Pada hari ke-6, jumlah sel mengalami penurunan sampai akhir fermentasi. Hal ini disebabkan karena jumlah nutrisi yang terdapat di dalam larutan teh mengalami penurunan dan kandungan polifenol teh dapat menghambat pertumbuhan khamir. Kondisi ini juga berkaitan dengan kadar gula reduksi yang menurun, sehingga mikrobia kekurangan makanan. Penghambatan oleh senyawa polifenol teh terhadap pertumbuhan khamir dilaporkan oleh Rose (1987) yang menyatakan bahwa senyawa polifenol teh dapat menghambat pertumbuhan beberapa spesies khamir. Namun pada kenyataannya, beberapa spesies khamir memanfaatkan senyawa polifenol teh sebagai sumber nutrisi dan energi. Sifat sebagai nutrisi dan antimikrobia bagi beberapa spesies khamir tergantung pada konsentrasi senyawa polifenol tersebut.

Dari data hasil penelitian terlihat bahwa jumlah sel kombucha teh hijau lebih tinggi daripada kombucha teh hitam. Hal ini disebabkan padatan terlarut dalam teh hijau lebih banyak daripada teh hitam. Seduhan teh hijau mengandung zat-zat padat terlarut, seperti gula, asam-asam amino, dan kafein. Zat-zat padat terlarut pada teh hijau tersebut dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi dan energi, sehingga semakin lama waktu fermentasi maka jumlah sel mikrobia pada teh hijau lebih banyak.

Menurut Sardjono et al. (1992), beberapa substrat tertentu, seperti senyawa alkohol, fenol, dan hidrokarbon, apabila jumlahnya berlebihan atau meningkat dapat menghambat pertumbuhan mikrobia. Terlihat jelas bahwa dalam penelitian ini digunakan larutan teh. Penurunan jumlah sel mikrobia dapat disebabkan oleh kadar alkohol pada media. Selain itu, polifenol merupakan senyawa antimikrobia (Rose 1987), sehingga pada jumlah tertentu bersifat toksik.

Rendahnya jumlah sel pada kombucha teh hitam disebabkan karena proses fermentasi pada pengolahan teh mempengaruhi rasa teh. Hasil oksidasi polifenol pertama adalah senyawa orthoquinon yang berwarna kekuningan dengan rasa yang sangat pahit. Ortho bersifat tidak stabil dan akan berubah menjadi theaflavin. Selanjutnya, theaflavin akan berubah menjadi polimer yang lebih kompleks yaitu thearubigin. Teh hitam mengandung senyawa theaflavin dan thearubigin. Kedua senyawa inilah yang menyebabkan teh hitam terasa pahit dan kondisi tersebut kurang sesuai untuk pertumbuhan mikrobia.

Kadar asam asetat

Pembentukan asam asetat dari alkohol oleh bakteri asam asetat berlangsung melalui dua tahap oksidasi. Crueger dan Crueger (1989) menyebutkan bahwa oksidasi tahap pertama mengubah alkohol menjadi asetaldehid oleh enzim NAD atau NADP-alkohol dehidrogenase. Asetaldehid dan air dapat membentuk keseimbangan reaksi dengan senyawa asetaldehid terhidrasi. Selanjutnya, oksidasi tahap kedua mengubah senyawa antara yaitu asetaldehid terhidrasi membentuk asam asetat. Oksidasi tahap kedua ini melibatkan enzim asetaldehid dehidrogenase. Selama oksidasi tersebut, 1 mol asam asetat dihasilkan dari 1 mol etanol, dan 6 ATP dihasilkan dari 1 mol asam asetat yang terbentuk. Oksidasi etanol menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat (*A. xylinum*) dilakukan secara aerob, dan dinamakan proses asetikasi.

Bakteri *A. xylinum* memiliki ciri-ciri morfologi antara lain: gram negatif, obligat aerob, berbentuk batang, membentuk kapsul, nonmotil, dan tidak membentuk spora. Obligat aerob artinya bakteri tersebut hanya tumbuh apabila tersedia oksigen. Pada penelitian ini, fermentasi asam asetat dilakukan dengan metode lambat, yaitu dengan cara mendinginkan cairan alkohol selama fermentasi. Bakteri asam asetat membentuk film pada lapisan permukaan, sekali film tersebut terbentuk dan tidak diganggu maka proses asetikasi berjalan cepat. Pembentukan asam asetat selama fermentasi pada teh kombucha hitam dan teh kombucha hijau ditampilkan pada Gambar 3.

Gambar 3 memperlihatkan bahwa semakin lama fermentasi berlangsung maka kadar asam semakin meningkat. Peningkatan total asam pada media terjadi karena terbentuknya senyawa-senyawa asam organik, terutama asam asetat. Total asam pada teh kombucha menentukan cita rasa teh kombucha sekaligus merupakan salah satu penentu mutu produk. Teh kombucha di Indonesia memiliki total asam berkisar antara 1-2% (Sugianto 1972). Bakteri *A. xylinum* mampu mengoksidasi etanol menjadi asam asetat.

Peningkatan total asam ditandai dengan penurunan pH. Semakin tinggi kadar asam, nilai pH semakin menurun. Kadar total asam pada teh hijau adalah dari 0,602% menjadi 1,151% pada hari ke-0 sampai hari ke-5, sedangkan untuk teh hitam yaitu dari 0,620% menjadi 1,160% pada hari ke-0 sampai hari ke-6. Konsentrasi asam asetat dalam kombucha hanya meningkat sampai batas tertentu lalu mengalami penurunan. Menurut Wood dan Lass (1985), kadar asam asetat mencapai puncak setelah 5,6 hari kemudian menurun. Penurunan laju pembentukan asam asetat disebabkan oleh laju pembentukan produk yang semakin tinggi, sehingga produk yang dihasilkan dapat menghambat reaksi penguraian substrat menjadi produk.

Kadar gula yang tinggi akan menghasilkan total asam yang lebih tinggi dibanding kadar gula yang rendah. Hal ini terlihat dari Gambar 3 pada akhir fermentasi, yaitu sebesar 1,059% pada teh hijau dan 0,954% teh hitam. Terbentuknya asam-asam organik terjadi karena oksidasi alkohol oleh bakteri asam asetat dengan bantuan enzim asetaldehid dehidrogenase. Sementara itu, teh hijau pada hari ke-6 dan teh hitam pada hari ke-7, kadar asam asetat turun masing-masing menjadi 1,126% dan 1,072%. Hal ini disebabkan karena persediaan gula semakin berkurang, sehingga bakteri asam asetat mengoksidasi asam asetat dalam memperoleh energi untuk pertumbuhan.

Jenis teh yang dihasilkan dengan cara pengolahan yang berbeda akan berpengaruh pada kadar asam asetat. Pada akhir fermentasi, kombucha teh hitam memiliki kadar asam asetat lebih kecil daripada kombucha teh hijau, karena teh hitam mengalami proses fermentasi yang sempurna. Proses fermentasi pada pengolahan teh tersebut menyebabkan senyawa polifenol dan berbagai komponen senyawa lainnya di dalam teh (polisakarida, pati, protein) menjadi teroksidasi. Proses pengolahan teh hijau tidak dilakukan melalui tahap fermentasi, karena fermentasi dapat menyebabkan hilangnya komponen-komponen yang berguna bagi kesehatan (Nazaruddin dan Paimin 1993), sehingga dimungkinkan masih banyak zat-zat (karbohidrat, protein, dan kelompok fenol seperti katekin) yang terkandung di dalam teh hijau. Sebagaimana dikemukakan Harler (1963) bahwa selama proses pelayuan teh hijau pada suhu tinggi menyebabkan enzim-enzim berada dalam kondisi inaktif, berkurangnya kandungan pati dan gum, disertai dengan naiknya kandungan gula (glukosa). Kandungan gula yang tinggi tersebut menjadikan kadar gula reduksi juga menghasilkan nilai tertinggi, sehingga diduga kadar asam tertinggi terdapat pada teh yang tidak mengalami proses fermentasi.

Meskipun pada teh hitam juga dilakukan proses pelayuan, tetapi pelayuan tersebut hanya dilakukan dengan cara mengembuskan udara panas (<30°C) ke pucuk daun, sehingga proses perubahan kimiawi dalam daun tidak terganggu. Menurut Fulder (2004), proses fermentasi menyebabkan teh menjadi pahit karena senyawa polifenol berubah menjadi theaflavin dan thearubigin, dan diduga senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas mikrobia. Padahal, pengolahan teh hijau tidak melalui proses fermentasi, sehingga diduga bakteri lebih sesuai hidup dalam kombucha teh hijau. Oleh karena itu, pada akhir

proses fermentasi, kombucha teh hijau mempunyai kadar asam lebih tinggi daripada kombucha teh hitam.

Pembentukan selulosa (nata) pada permukaan media menunjukkan adanya aktivitas bakteri asam asetat. Bakteri asam asetat selain dapat merombak alkohol menjadi asam asetat, juga mampu membentuk selulosa dari glukosa yang terdapat pada media. *Acetobacter xylinum* akan mengubah glukosa menjadi prekursor pada membran sel yang kemudian disekresikan ke bagian luar sel menjadi selulosa (Mulyani 2003). Bakteri *A. xylinum* apabila ditumbuhkan pada media yang mengandung gula akan mengubah 19% gula yang tersedia menjadi selulosa (Thiman dan Kenneth 1955). Bakteri *A. xylinum* membentuk asam dari glukosa, etil alkohol, propil alkohol, dan glikol, serta mengoksidasi asam asetat menjadi senyawa CO_2 dan H_2O . Sifat spesifik dari bakteri tersebut adalah kemampuannya untuk membentuk selaput tebal pada permukaan cairan yang merupakan komponen selulosa (Lapaz et al. 1967).

Pada awal pembentukan, selulosa akan dihasilkan pertama kali dalam medium dalam bentuk tidak berstruktur, sebagai material yang dilepaskan oleh sel dan terdiri dari molekul-molekul yang terdistribusi secara acak. Kondisi ini menunjukkan selulosa kemungkinan tidak dibentuk secara utuh oleh bakteri, tetapi terbentuk kemudian di dalam larutan (Gunsalus dan Stainer 1962). Serabut selulosa yang disekresikan akan membentuk jaringan yang lepas menutupi sel yang secara bertahap menutupi permukaan cairan medium fermentasi. Konsentrasi gula yang semakin tinggi pada medium fermentasi menyebabkan kelarutan oksigen semakin rendah, sedangkan bakteri membutuhkan oksigen untuk pertumbuhannya yang mengakibatkan menurunnya aktivitas metabolisme bakteri untuk pertumbuhannya, dan hal ini dapat menyebabkan menurunnya aktivitas pembentukan selulosa.

Nilai pH (potensial hidroksida)

Dalam fermentasi, kontrol pH penting dilakukan karena pH yang optimum harus dipertahankan selama fermentasi. Perubahan pH dapat terjadi selama fermentasi. Nilai pH teh kombucha selama fermentasi ditampilkan pada Gambar 4.

Perubahan pH dapat terjadi karena ion H dilepaskan selama konsumsi NH_4^+ dan dikonsumsi selama metabolisme NO_3^- dan penggunaan asam amino sebagai sumber karbon. Perubahan pH selama fermentasi dipengaruhi oleh substrat gula menjadi produk alkohol dan asam asetat. Semakin tinggi penurunan asam maka nilai pH semakin rendah. Asam asetat yang terbentuk merupakan hasil metabolisme bakteri pembentuk asam asetat, sehingga akan menurunkan pH media. Nilai pH pada kombucha teh hitam berkisar antara 3-4 dan kombucha teh hijau 3-5. Nilai pH awal teh hijau lebih tinggi dibanding kombucha teh hitam.

Dari Gambar 4 terlihat bahwa hasil analisis terhadap nilai pH teh kombucha cenderung menurun selama fermentasi berlangsung. Hal ini berkaitan dengan kadar asam asetat teh yang cenderung meningkat. Namun, terlihat bahwa pada fermentasi hari ke-6 dengan turunnya kadar asam asetat, nilai pH-nya tetap menurun. Hal ini disebabkan karena teh mengandung protein. Dalam 100 g

teh hijau mengandung protein sebesar 24 g, sedangkan pada teh hitam sebesar 19,4 g. Perubahan komponen protein oleh enzim protease diubah menjadi senyawa protein dengan berat molekul yang lebih kecil, yaitu asam-asam amino. Asam amino adalah senyawa organik yang memiliki gugus fungsional karboksil ($-\text{COOH}$) dan amina ($-\text{NH}_2$). Gugus karboksil memberikan sifat asam.

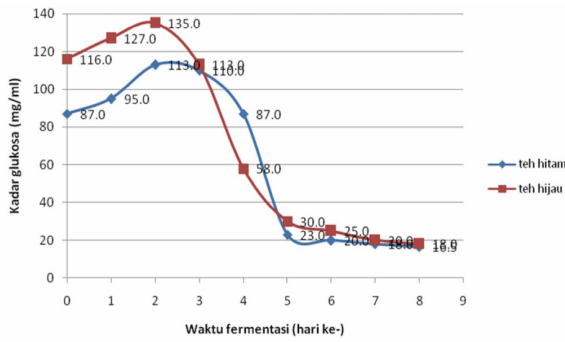
Jenis teh berpengaruh terhadap pH teh kombucha. Hal ini disebabkan karena perbedaan jumlah senyawa polifenol dan katekin pada teh yang menyebabkan rasa pahit dan sepat, sehingga mempengaruhi aktivitas mikrobia dan khamir dalam menguraikan sukrosa menjadi monosakarida yang nantinya akan diubah menjadi etanol dan karbon dioksida. Etanol tersebut dioksidasi membentuk asam.

Katekin merupakan senyawa kompleks turunan dari polifenol, yang mampu mengendapkan protein dari larutan serta dapat membentuk kompleks dengan polisakarida, asam nukleat, dan alkaloid (Shahidi dan Nacz 1995). Karakteristik katekin pada umumnya berbentuk kristal, menyebabkan rasa sepat dan segar, serta mudah larut dalam air panas dan alkohol. Perubahan pH tersebut terjadi karena adanya aktivitas enzim amilolitik yang dihasilkan oleh khamir selama fermentasi sehingga mengakibatkan nilai keasaman meningkat. Sebagaimana dikemukakan oleh bahwa asam merupakan substansi yang menyumbang ion hidrogen, sedangkan basa merupakan substansi yang menyumbang ion hidroksida. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi kandungan asam maka semakin rendah angka derajat keasamannya.

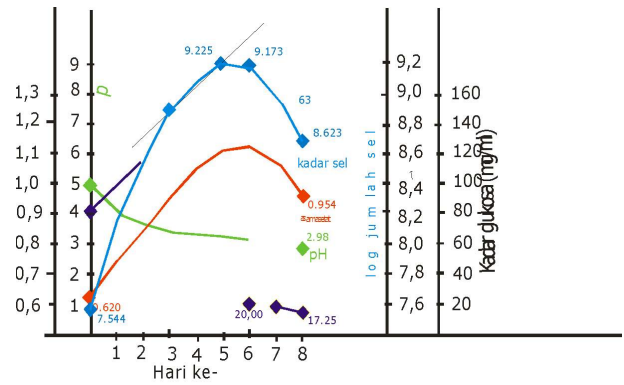
Kinetika fermentasi

Fermentasi adalah perubahan zat gula menjadi alkohol, CO_2 , energi, dan zat-zat lainnya terutama zat organoleptik yang menimbulkan aroma dan rasa yang khas. Teh kombucha merupakan produk fermentasi oleh khamir dan bakteri asam asetat pada media yang mengandung gula dan difermentasi selama 8-12 hari (Naland 2003). Pada penelitian ini, terjadi dua proses fermentasi, yaitu fermentasi alkohol dan fermentasi asam asetat. Khamir yang terlibat dalam fermentasi kombucha ini adalah *S. cereviceae*, sedangkan bakteri asam asetat yang terlibat adalah *A. xylinum*. Khamir berperan merombak gula menjadi alkohol, sedangkan bakteri asam asetat mengoksidasi alkohol menjadi asam asetat.

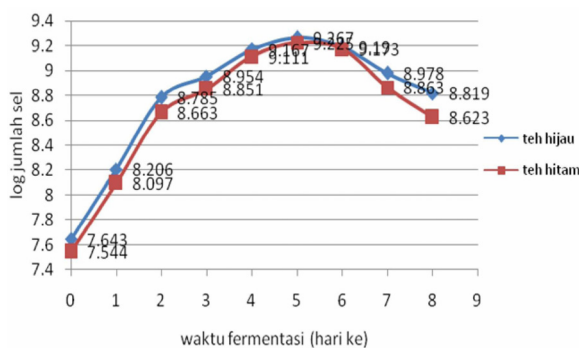
Menurut Desrosier (1969), terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi fermentasi, yaitu pH, suhu, dan substrat. Pada penelitian ini, nilai pH antara 3-5 merupakan pH yang optimal untuk pertumbuhan *yeast*. Suhu yang digunakan pada penelitian ini (30°C) merupakan suhu yang optimal untuk mikrobia mesofilik ($20-30^\circ\text{C}$). Sementara itu, substrat yang digunakan adalah sukrosa, yang nantinya akan dihidrolisis oleh enzim invertase menjadi glukosa dan fruktosa. Hasil analisis kadar sel, kadar asam asetat, kadar glukosa, dan pH pada kombucha teh hitam (Gambar 5) dan kombucha teh hijau ditampilkan pada Gambar 6.



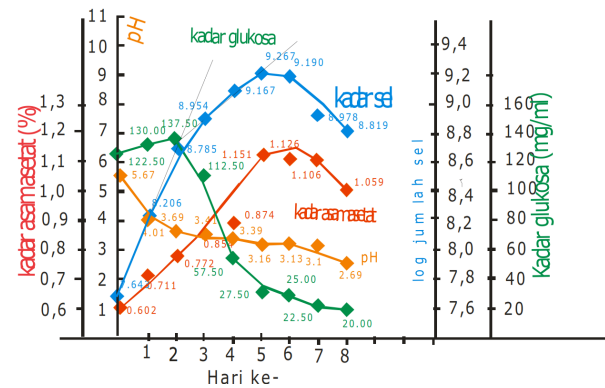
Gambar 1. Kadar gula reduksi teh kombucha selama fermentasi



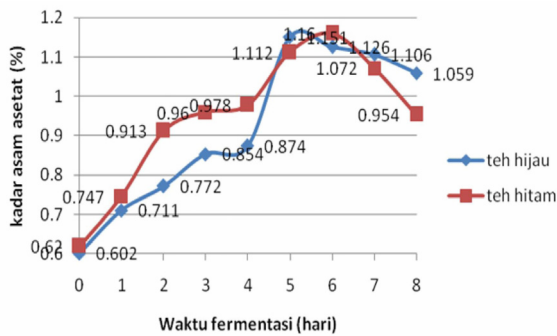
Gambar 5. Kadar sel, kadar gula reduksi, kadar asam asetat, dan nilai pH selama fermentasi pada kombucha teh hitam



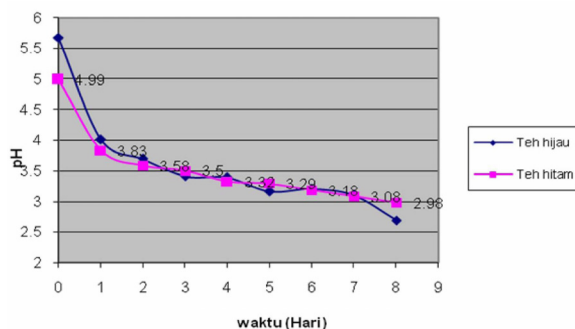
Gambar 2. Kurva kadar sel mikrobia pada teh kombucha selama fermentasi



Gambar 6. Hasil analisa kadar sel (cfu/ml), kadar asam asetat (%v/v), kadar gula reduksi (mg/ml), dan pH kombucha teh hijau



Gambar 3. Kurva kadar asam asetat pada teh kombucha selama fermentasi



Gambar 4. Nilai pH pada teh kombucha selama fermentasi

Berdasarkan produk dan pertumbuhan sel, fermentasi kombucha ini termasuk tipe pertumbuhan *associated*, yaitu suatu proses dengan pertumbuhan sel dan pembentukan produk berjalan seiring (Gambar 5-6). Mikroorganisme tumbuh dalam spektrum yang luas dalam lingkungan fisik maupun kimia. Pertumbuhan dan aktivitas fisiologis lainnya ternyata merupakan respons lingkungan fisiologis sekitarnya. Kinetika fermentasi menggambarkan pertumbuhan dan pembentukan produk oleh mikroorganisme, tidak hanya sel-sel yang aktif, tetapi juga sel yang istirahat, bahkan juga sel-sel yang mati, karena banyak produk komersial yang dihasilkan setelah berhentinya pertumbuhan. Dari Gambar 5-6 dilakukan penentuan parameter-parameter kinetika fermentasi, antara lain kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) dalam suasana aerob dan anaerob, hasil pertumbuhan (*growth yield constant*), Y_x/s , pembentukan produk (*product yield constant*), Y_p/s , efisiensi produksi asam asetat terhadap glukosa, waktu penggandaan (*doubling time*), dan banyaknya penggandaan (N).

Kecepatan pertumbuhan spesifik yaitu kecepatan pertumbuhan per satuan jumlah biomassa ($1/x$) (dx/dt) dan mempunyai satuan yang berupa kebalikan dari satuan waktu ($1/t$) (Wibowo 1990). Tahap fermentasi dibagi menjadi dua tahap yaitu fermentasi aerob dan anaerob. Selama fermentasi aerob berlangsung, gula akan diubah

menjadi CO₂, H₂O, dan energi. Proses fermentasi aerob sering juga disebut sebagai masa pertumbuhan *yeast*. Setelah masa pertumbuhan *yeast* berakhir, ditandai dengan habisnya oksigen, maka proses fermentasi anaerob dimulai. Pada tahap ini, *yeast* mampu mengubah gula menjadi alkohol, CO₂, dan energi. Dalam fermentasi ini, ternyata suasana aerob berlangsung selama kira-kira 2 hari (dapat dilihat dari data kadar sel yang digambarkan sebagai hubungan ln (kadar sel) dan waktu, seperti pada Gambar 5-6 menunjukkan kecepatan pertumbuhan yang tinggi. Selanjutnya, kecepatan pertumbuhan menurun yang ditunjukkan oleh penggal garis B, sampai akhirnya dicapai fase stasioner pada hari ke-5. Hal ini terlihat pada Gambar 5-6, baik pada kombucha teh hijau maupun kombucha teh hitam.

Berdasarkan pada laju pertumbuhan, pertumbuhan mikrobial dapat dibagi menjadi 4 fase, yaitu fase pertumbuhan lambat (*lag phase*), fase pertumbuhan eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Pada Gambar 5-6 tampak bahwa tidak terdapat fase lag atau fase adaptasi, tetapi langsung masuk ke fase logaritmik, pada tersebut ditunjukkan oleh garis A. Fase log adalah periode pertumbuhan seimbang atau status mantap dengan laju pertumbuhan spesifik konstan (Jodoamidjojo et al. 1992). Fase log ini muncul sebagai garis lurus.

Pada fermentasi ini, laju pertumbuhan khamir lebih dominan karena kondisi fermentasinya lebih mendukung dibanding laju pertumbuhan bakteri yang lambat. Dari Tabel 5, kombucha teh hitam dengan kadar awal sel $3,5 \times 10^7$ cfu/ml, dan setelah 2 hari, kadar sel naik menjadi $4,60 \times 10^8$ cfu/ml, maka diperoleh kecepatan pertumbuhan spesifik sebesar 0,054/jam, sedangkan pada suasana anaerob berlangsung mulai hari ke-3 sampai hari ke-5. Fase logaritmik dalam suasana anaerob ini digambarkan oleh penggal garis lurus B yang merupakan garis pendekatan yang paling mungkin. Dari data pembentukan sel mikrobial dapat diperoleh kecepatan pertumbuhan spesifik yaitu sebesar 0,018/jam.

Pada kombucha teh hijau (Gambar 6) dapat dilihat bahwa suasana aerob juga terjadi selama 2 hari dengan kadar awal sel $4,4 \times 10^7$ cfu/ml dan setelah 2 hari naik menjadi $6,10 \times 10^8$ cfu/ml, sehingga diperoleh kecepatan pertumbuhan spesifik sebesar 0,055/jam, sedangkan dalam suasana anaerob sebesar 0,015/jam. Kecepatan pertumbuhan spesifik aerob lebih tinggi pada kombucha teh hijau, sedangkan kecepatan pertumbuhan spesifik anaerob lebih tinggi pada kombucha teh hitam.

Hal ini menunjukkan bahwa sel lebih cepat tumbuh dalam suasana aerob pada kombucha teh hijau, dan suasana anaerob pada kombucha teh hitam. Dengan uji *t-test*, kecepatan pertumbuhan spesifik anaerob berbeda nyata. Hal ini dikarenakan seduhan teh hijau mengandung kadar gula reduksi yang lebih tinggi, sehingga kecepatan pertumbuhan spesifik juga lebih tinggi. Gula reduksi digunakan sebagai substrat untuk pertumbuhan sel mikrobial.

Pertumbuhan dan pembentukan hasil (*growth yield*) adalah proses biokonversi bahan-bahan kimia nutrisi dalam fermentasi menjadi massa sel dan/atau produk metabolik (Jodoamidjojo 1992). Hal ini dinyatakan dengan

Y_x/s dan Y_p/s. Pola pertumbuhan kedua mikroorganisme (*yeast* dan bakteri asam asetat) dalam fermentasi kombucha menunjukkan adanya simbiosis, terutama dalam hal penyediaan nutrisi dan kondisi substrat bagi masing-masing mikroorganisme. Sel-sel khamir menghasilkan alkohol dan beberapa asam organik sebagai substrat dan prekursor bagi aktivitas sel-sel bakteri.

Dalam fermentasi ini, Y_x/s sebesar $2,425 \times 10^7$ cfu/mg dan Y_p/s sebesar 0,081 untuk kombucha teh hitam, sedangkan kombucha teh hijau Y_x/s sebesar $1,901 \times 10^7$ cfu/mg dan Y_p/s sebesar 0,064. Y_x/s menyatakan banyaknya substrat yang digunakan untuk pertumbuhan sel, sedangkan Y_p/s menyatakan banyaknya substrat yang digunakan untuk pembentukan asam asetat. Oleh karena tanpa adanya sel tidak akan terjadi pembentukan hasil maka pembentukan hasil dan pertumbuhan ditentukan oleh pemanfaatan nutrisi. Semua organisme memerlukan nutrisi dasar sebagai sumber karbon, nitrogen, energi, dan faktor esensial pertumbuhan (mineral dan vitamin) untuk menopang pertumbuhannya. Fermentasi kombucha ini menggunakan glukosa sebagai substrat dan sumber karbon.

Pembentukan produk dan pertumbuhan sel pada kombucha teh hitam lebih tinggi daripada kombucha teh hijau. Hal ini menunjukkan bahwa substrat pada kombucha teh hitam lebih efisien untuk pembentukan produk dan pertumbuhan sel dibanding pada kombucha teh hijau. Dengan uji *t-test*, pertumbuhan sel dan pembentukan produk antara kedua jenis teh tersebut tidak berbeda nyata. Hal tersebut disebabkan karena zat padat terlarut pada teh hijau dan teh hitam masing-masing sebesar 37,41% dan 36,23%. Jumlah zat padat terlarut digunakan sebagai nutrisi dan sumber energi untuk pertumbuhan sel dan pembentukan produk. Jumlah zat padat terlarut antara kedua jenis teh tidak berbeda jauh, sehingga pertumbuhan sel dan pembentukan produknya tidak berbeda nyata.

Efisiensi produksi asam asetat terhadap gula reduksi yaitu perbandingan antara gula reduksi yang diubah menjadi asam asetat dengan gula reduksi mula-mula selama 8 hari fermentasi. Efisiensi produksi asam asetat terhadap gula reduksi pada kombucha teh hijau dan teh hitam masing-masing sebesar 11,814% dan 11,510%. Hal ini menunjukkan bahwa gula reduksi yang digunakan untuk pembentukan asam asetat pada kombucha teh hijau lebih efisien daripada kombucha teh hitam. Dengan uji *t-test*, efisiensi produksi asam asetat terhadap kadar gula reduksi antara kedua jenis teh tidak berbeda nyata. Hal ini disebabkan asam asetat yang terbentuk dari kedua jenis teh kombucha tersebut tidak berbeda secara signifikan. Asam asetat yang terbentuk pada akhir fermentasi pada kombucha teh hijau sebesar 1,059% dan pada kombucha teh hitam sebesar 0,954%. Rendahnya efisiensi produksi asam asetat terhadap gula reduksi pada kedua jenis kombucha tersebut disebabkan karena gula reduksi tidak hanya digunakan untuk pembentukan asam asetat, tetapi juga untuk pembentukan alkohol, pertumbuhan sel, dan pembentukan selulosa.

Waktu generasi (td) adalah waktu yang dibutuhkan oleh suatu kultur untuk memperbanyak jumlah sel, massa sel, atau komponen sel sebanyak dua kali lipat, misalnya dari satu sel menjadi dua sel. Pada penelitian ini, waktu

generasi dalam suasana aerob pada kombucha teh hitam lebih tinggi daripada teh hijau, masing-masing yaitu 12,8 jam dan 12,6 jam. Sementara itu pada suasana anaerob, waktu generasi kombucha teh hijau lebih tinggi daripada teh hitam, masing-masing yaitu 46,2 jam dan 38,5 jam. Hal ini menunjukkan waktu penggandaan sel pada suasana aerob pada kombucha teh hitam lebih tinggi daripada kombucha teh hijau, sebaliknya pada suasana anaerob. Dengan uji *t-test*, waktu generasi anaerob antara kedua teh tersebut berbeda nyata. Hal ini dipengaruhi oleh kecepatan pertumbuhan spesifik pada jenis teh kombucha. Semakin tinggi kecepatan pertumbuhan spesifik maka waktu penggandaan menjadi lebih singkat.

Selama 8 hari fermentasi, sel melakukan penggandaan yang dapat dinyatakan dengan N (banyaknya penggandaan dari suatu biomassa). Pada penelitian ini, banyaknya penggandaan sel pada kombucha teh hitam dan teh hijau masing-masing adalah 3,583 dan 3,875. Dengan uji *t-test*, banyak penggandaan kedua teh tersebut berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa sel pada kombucha teh hijau lebih cepat memperbanyak diri, disebabkan karena kadar gula reduksi lebih tinggi. Semakin tinggi kadar gula reduksi maka semakin banyak nutrisi atau energi untuk penggandaan sel.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut. Perilaku kinetika fermentasi pada kombucha teh hijau antara lain kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) aerob dan anaerob masing-masing yaitu 0,055/jam dan 0,015/jam, *Growth Yield Constant* (Y_x/s) dan *Product Yield Constant* (Y_p/s) masing-masing sebesar $1,901 \times 10^7$ cfu/mg dan 0,064, waktu penggandaan (td) aerob dan anaerob masing-masing 12,6 jam dan 46,2 jam, derajat multiplikasi 3,875 kali, dan efisiensi pembentukan asam asetat terhadap gula reduksi sebesar 11,814%. Sementara itu, perilaku kinetika fermentasi pada kombucha teh hitam antara lain kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) aerob dan anaerob masing-masing yaitu 0,054/jam dan 0,018/jam, *Growth Yield Constant* (Y_x/s) dan *Product Yield Constant* (Y_p/s) masing-masing sebesar $2,425 \times 10^7$ cfu/mg dan 0,081, waktu penggandaan (td) aerob dan anaerob masing-masing yaitu 12,8 jam dan 38,5 jam, derajat multiplikasi 3,583 kali, dan efisiensi pembentukan asam asetat terhadap gula reduksi sebesar 11,510%. Kecepatan pertumbuhan spesifik anaerob, waktu generasi anaerob, dan banyaknya penggandaan antara kombucha teh hijau dan kombucha teh hitam berbeda nyata, sedangkan pertumbuhan sel, pembentukan produk, dan efisiensi produksi asam asetat terhadap gula reduksi tidak berbeda nyata. Kombucha teh

hitam memiliki kecepatan pertumbuhan spesifik anaerob yang tinggi, pertumbuhan sel dan pembentukan produk tinggi, dan waktu generasi anaerob rendah, sehingga dalam pembuatan teh kombucha lebih efektif digunakan teh hitam.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriyantono. 1988. Analisis pangan. IPB Press, Bogor.
- Crueger W, Crueger A. 1989. Organic acids in biotechnology. A Text Book of Industrial Microbiology Science Technology. Madison Inc., USA.
- Desrosier NW. 1969. Teknologi pengawetan pangan. Penerjemah: Mulijohardjo M. Universitas Indonesia (UI-Press), Jakarta.
- Fulder S. 2004. Khasiat teh hijau. Penerjemah: Wilujeng TR. Prestasi Pustaka Publisher, Jakarta.
- Gunzalus IC, Stainer RY. 1962. The bacteria, A treatise on structure and function. Academic Press Inc., New York and London.
- Harler S. 1963. Tea manufacture. Oxford University Press, London.
- Hartoyo A. 2003. Teh dan khasiatnya bagi kesehatan. Kanisius, Yogyakarta.
- Jodoamidjojo M, Abdul AD, Endang GS. 1992. Teknologi fermentasi. Rajawali Pers, Jakarta.
- Lapaz MM, Galorda EG, Pale MA. 1967. The nata organism-cultural requirement, characteristic, and identity. The Philipp J Sci 96: 91-109.
- Mulyani TP. 2003. Pengaruh Waktu Inkubasi pada Fermentasi Cairan Kopi dengan Inokulum "Kultur Kombucha" terhadap Kadar Gula Reduksi, Daya Antibiotik dan Pembentukan Asam. [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Naland H. 2003. Kombucha teh ajaib pencegah dan penyembuh aneka penyakit. PT Agromedia, Jakarta.
- Nazaruddin, Paimin. 1993. Teh, Pembudidayaan dan pengolahan. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Paimin FR. 2001. Jamur dipo harus tepat dosis. Trubus, Jakarta.
- Rahayu ES, Kuswanto KR. 1987. Teknologi pengolahan minuman beralkohol. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ranggana S. 1997. Manual of analysis of fruit and vegetables product. Tata McGraw Publishing Company Limited, New Delhi.
- Roberts EA, Smith RF. 1961. Spectrophotometric measurement of theaflavin and thearubigins in black tea liquor in assessment of quality in tea. Analyst 86: 94-98.
- Rose AH. 1987. Teh yeast. In: Anthony H, Rose (eds). Academic Press, Toronto.
- Sarjono, Rahayu K, Sudarmadji S. 1992. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in mixed culture with *Aspergillus oryzae*. ASEAN Food J 7: 30-33.
- Setiawati I, Nasikun. 1991. Teh, kajian sosial dan ekonomi. Aditya Media, Yogyakarta.
- Shahidi F, Nacz M. 1995. Food phenolics: Sources, chemistry, effects and applications. Technomic Publishing Company Inc., Lancaster.
- Sugianto S. 1972. Tea cider dan cara pembuatannya. Menara Perkebunan 40. IPB, Bogor.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 1984. Prosedur analisa untuk bahan makanan dan pertanian. Liberty, Yogyakarta.
- Thimann, Kenneth V. 1955. The life of bacteria. The Macmillan Company, New York.
- Wibowo D. 1990. Teknologi fermentasi. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Wood GRA, Lass RA. 1985. Cocoa. 4th edition. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Zhang A, Chan PT, Luk YS et al. 1997. Inhibitory effect of jasmine green tea epicatechin isomers on LDL-oxidation. Nut Biochem 8: 334-340.