

## ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA TEH HIJAU KOMBUCHA BERDASARKAN WAKTU FERMENTASI YANG OPTIMAL

Nursyah Putri Hassmy<sup>1)</sup>, Jemmy Abidjulu<sup>1)</sup>, dan Adithya Yudistira<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi, FMIPA UNSRAT, Manado, 95115

### ABSTRACT

*Kombucha tea is a traditional beverage product of fermented tea and sugar solution by using starter kombucha (Acetobacter xylinum and some of yeast species). The low productivity of contamination from harmful microorganisms causing the disease makes kombucha safe for self-prepared at home without pathogenic risks for health. The purpose of this study is to determine the optimal value of antioxidant activity on kombucha green tea basen on fermentation time. To test antioxidant activity, the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical method was used to measure antioxidant activity based on the ability to capture DPPH radicals and statistical test data was using ANOVA and Post Hoc Multiple Comparisons methods. From the results of the study showed that fermentation on day 1 to day 5 kombucha green tea has optimal antioxidant activity.*

**Keywords :** *Kombucha Tea, Antioxidant Activity, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)*

### ABSTRAK

Teh kombucha merupakan produk minuman tradisional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan *starter* kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir). Rendahnya produktivitas kontaminasi dari mikroorganisme berbahaya yang menyebabkan penyakit membuat kombucha aman untuk dipersiapkan sendiri di rumah tanpa risiko patogenik untuk kesehatan. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui nilai aktivitas antioksidan yang optimal pada teh hijau kombucha berdasarkan waktu fermentasinya. Untuk menguji aktivitas antioksidan digunakan metode radikal DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl) aktivitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuan untuk menangkap radikal DPPH dan uji data statistik menggunakan metode ANOVA dan *Post Hoc Multiple Comparisons*. Dari hasil penelitian menunjukkan fermentasi dihari ke – 1 sampai dengan hari ke – 5 teh hijau kombucha memiliki aktivitas antioksidan yang optimal.

**Kata Kunci :** *Teh Kombucha, Aktivitas Antioksidan, DPPH (1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl)*

## **PENDAHULUAN**

Ada sejenis minuman kesehatan yang diketahui mengandung banyak sekali manfaat bagi tubuh manusia minuman kesehatan itu merupakan minuman dari air seduhan teh. Minuman seduhan teh tersebut dikenal dengan nama teh Kombucha atau *Kombucha tea*. Minuman ini adalah minuman kesehatan yang sudah dikenal sejak jaman dahulu di berbagai negara seperti China, Rusia, dan Jerman. Teh Kombucha ini juga cukup populer di Indonesia (Aryadnyani, 2012).

Jenis teh kombucha sendiri yang sering dikonsumsi oleh banyak orang salah satunya ialah jenis teh hijau. Teh hijau telah banyak diteliti memiliki banyak kandungan yang bermanfaat seperti air, mineral, vitamin, polifenol, dan antioksidan (Anantaboga, 2012).

Teh kombucha merupakan produk minuman tradisional hasil fermentasi larutan teh dan gula dengan menggunakan *starter* kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir) (Wistiana dan Zubaidah, 2015). Rendahnya produktivitas kontaminasi dari mikroorganisme berbahaya yang menyebabkan penyakit membuat kombucha aman untuk dipersiapkan sendiri di rumah tanpa risiko patogenik untuk kesehatan (Talawat *et al.*, 2006).

Teh Kombucha merupakan salah satu minuman yang telah dikenal memiliki aktivitas antioksidan, meningkatnya aktivitas antioksidan pada teh kombucha sendiri disebabkan karena adanya fenolik bebas yang dihasilkan selama proses fermentasi, sehingga semakin tinggi kadar fenolik yang dihasilkan, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Suhardini dan Zubaidah, 2016).

Menguji aktivitas antioksidan digunakan metode radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), karena metode ini cukup sederhana, mudah dikerjakan, dan tidak membutuhkan banyak waktu. Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuan untuk menangkap radikal DPPH. Keberadaan antioksidan akan menetralkan radikal DPPH dengan menyumbangkan elektron kepada DPPH, menghasilkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Penghilangan warna akan sebanding dengan jumlah elektron yang diambil oleh DPPH sehingga dapat diukur secara spektrofotometri (Jaya *et al.*, 2012)

## **METODE PENELITIAN**

Alat ukur analitis yang digunakan adalah seperangkat instrumen Spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu 00787) dan pH meter (Elmetron CP-505). Alat tambahan untuk penelitian ini seperti cawan petri, gelas ukur, pipet tetes, mikro pipet, aluminium foil, teko listrik *stainless steel*, kain bersih dan gelang karet.

Bahan yang digunakan adalah produk teh hijau lokal yang beredar di pasaran Kota Manado, kultur starter jamur kombucha, larutan *2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl* (DPPH), metanol (p.a), aquadest dan gula pasir.

### **Prosedur Kerja**

#### **Pengambilan Sampel**

Daun teh diperoleh dari produk teh lokal yang beredar di pasar Kota Manado, kemudian kultur starter jamur kombucha diperoleh dari pabrik kultur kombucha lokal yang ada dan beredar di Indonesia.

Teh dibuat dengan memasukkan 5 kantong teh seduhan celup (8 gram) dan ditambahkan air sebanyak 1500 ml dengan gula 150 gram (15% dari volume air seduhan teh). Selanjutnya sampel dianalisis di Laboratorium Kimia Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sam Ratulangi.

### **Pembuatan Larutan Induk**

Sejumlah 0,5 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a didapatkan konsentrasinya 10 mg/L

### **Pembuatan Larutan Kontrol**

Pembuatan larutan kontrol didahului dengan pembuatan larutan induk DPPH 10 mg/L diaduk hingga homogen. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C

### **Pengukuran pH**

Pengukuran pH sampel teh kombucha dilakukan dengan cara mengambil sekitar 100 mL larutan teh kombucha kemudian dimasukkan ke dalam beker gelas kemudian diukur pH larutan teh kombucha menggunakan pH meter.

### **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH, dilakukan dengan mengambil larutan induk DPPH dengan konsentrasi 10 mg/L, diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400 sampai 800 nm.

### **Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH**

Untuk pengujian aktivitas antioksidan, sebanyak 1 mL larutan DPPH (10 mg/L) ditambahkan 50 µL larutan sampel lalu ditambahkan metanol p.a hingga 5 mL, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 513 nm.

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{Inhibisi} = \frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.Sampel}}{\text{Abs.kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs kontrol : Serapan radikal DPPH 10 mg/L pada panjang gelombang 513 nm.

Abs Sampel: Serapan sampel dalam radikal DPPH 10 mg/mL pada panjang gelombang 513 nm

### **Analisis Data**

Semua data kuantitatif untuk mengetahui pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan dan pH dilakukan analisis data secara statistik menggunakan metode *One-Way ANOVA* pada taraf kepercayaan 95% dan untuk menganalisis lebih lanjut tentang pengaruh pH terhadap waktu fermentasi dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Multiple Comparisons*. Analisis statistik dilakukan

dengan menggunakan program aplikasi IBM SPSS Statistics 22 Version.

Tabel. 1 Hasil analisis pengukuran pH Teh Hijau Kombucha berdasarkan waktu fermentasi optimal yang telah ditentukan sebagai berikut :

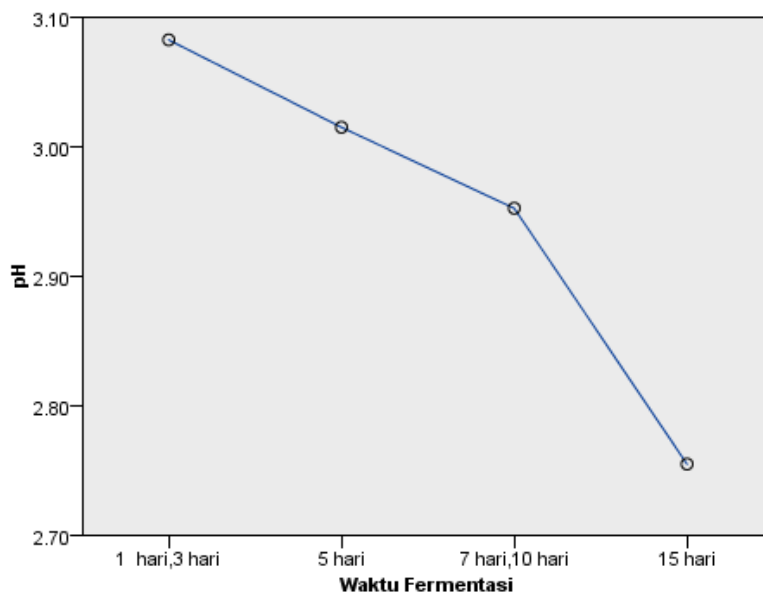
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Analisis pH**

Waktu Fermentasi	Hasil Pengukuran	
	pH	Standar Deviasi (SD)
Hari ke – 1	3,11	0,021
	3,08	
Hari ke – 3	3,08	0,014
	3,06	
Hari ke – 5	3,02	0,007
	3,01	
Hari ke – 7	3,00	0.035
	2,95	
Hari ke – 10	2,95	0.028
	2,91	
Hari ke – 15	2,76	0.007
	2,75	

Pada hasil penelitian ini teh hijau kombucha mengalami penurunan pH yang cukup besar

akibat bertambahnya waktu fermentasi (Gambar 1):



Gambar 1 Kurva pengaruh waktu fermentasi terhadap nilai pH Teh Hijau Kombucha (Menggunakan program aplikasi SPSS)

Nilai asam pada seduhan Teh Hijau Kombucha semakin meningkat dan pH pada larutan Teh Hijau Kombucha menurun, hal ini dikarenakan menurut (Jasman dan Widiyanto, atau gula yang terdapat dalam larutan seduhan teh hijau dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik, tingginya kadar gula dalam larutan teh menyebabkan peningkatan aktivitas mikroorganisme dan asam organik. Semakin tinggi asam organik yang terdapat dalam kombucha maka total asam yang dihasilkan semakin tinggi sehingga menurunkan pH pada larutan teh. Penurunan nilai pH dalam fermentasi menurut (Fardiaz, 1988) akan mendukung kehidupan bakteri *Acetobacter Xylinum* dalam kultur kombucha

2012) selama proses fermentasi khamir dan bakteri *Acetobacter Xylinum* yang terdapat di *starter* atau jamur kombucha melakukan metabolisme terhadap sukrosa untuk melangsungkan aktivitas metabolismenya. Asam yang terlarut akan terdisosiasi untuk melepaskan proton-proton bebas yang menurunkan pH larutan pada Teh Hijau Kombucha

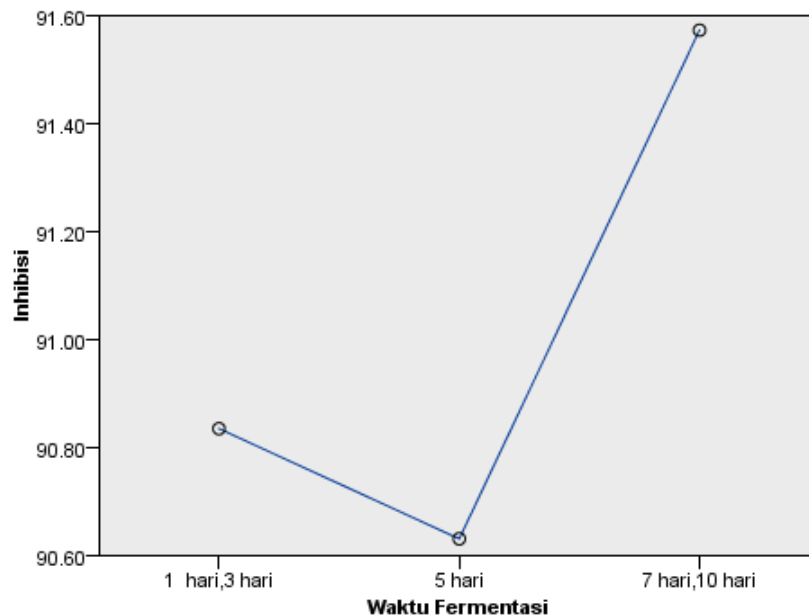
**Analisis Antioksidan**

Tabel. 2 Hasil analisis aktivitas antioksidan Teh Hijau Kombucha berdasarkan waktu fermentasi optimal yang telah ditentukan sebagai berikut :

Waktu Fermentasi	Hasil Pengukuran	
	%P	Standar Deviasi (SD)
Hari ke – 1	90,835	0.000
	90,835	
Hari ke – 3	90,631	0.000
	90,631	
Hari ke – 5	91,853	0.000
	91,853	
Hari ke – 7	91,853	1,008
	90,427	
Hari ke – 10	91,649	0,286
	92,057	
Hari ke – 15	91,649	0,286
	91,242	

Keterangan : %P merupakan nilai penangkapan radikal bebas DPPH diukur berdasarkan waktu fermentasi optimal yang telah ditentukan.

Pada hasil penelitian ini teh hijau kombucha mengalami peningkatan aktivitas antioksidan dengan dilihat dari nilai persentase penangkapan radikal DPPH (%P) akibat bertambahnya waktu fermentasi (Gambar 2):



Gambar 2 Kurva pengaruh waktu fermentasi terhadap aktivitas antioksidan Teh Hijau Kombucha (Menggunakan program aplikasi SPSS).

Peningkatan aktivitas antioksidan pada teh hijau kombucha diakibatkan oleh hasil metabolisme mikroorganisme pada kombucha selama proses fermentasi (Goh *et al.*, 2012). Menurut (Jayabalan *et al.*, 2008) metabolisme mikroorganisme pada kombucha meningkatkan senyawa fenol karena adanya proses biotransformasi yang memanfaatkan enzim suatu sel tanaman untuk meningkatkan aktivitas biologis tertentu. Selain itu daun teh yang digunakan sebagai bahan baku teh Kombucha mengandung golongan senyawa fenol yang dapat meningkat seiring lamanya fermentasi. Meningkatnya aktivitas antioksidan disebabkan karena adanya fenolik bebas yang dihasilkan selama proses fermentasi, sehingga semakin tinggi kadar fenolik yang dihasilkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Penurunan aktivitas antioksidan yang terjadi di hari ke – 15 menurut (Sukmawati *et al.*, 2013) selama

proses fermentasi terjadi juga peningkatan jumlah asam-asam organik karena aktivitas khamir dan bakteri yang berada dalam kombucha. Suasana asam menyebabkan senyawa fenolik menjadi semakin stabil dan sulit melepaskan proton yang dapat berikatan dengan DPPH sehingga aktivitas antioksidannya menurun.

Berdasarkan hasil analisis yang ditunjukkan pada Tabel. 3 terjadi peningkatan aktivitas antioksidan pada teh hijau kombucha walaupun diiringi dengan penurunan pH yang terjadi selama proses fermentasi. Untuk melihat aktivitas antioksidan yang optimal pada teh hijau kombucha dilihat berdasarkan pH aman untuk dikonsumsi pada Tabel.3 menunjukkan bahwa di hari ke – 1 sampai dengan hari ke – 5 teh hijau kombucha memiliki aktivitas antioksidan yang optimal karena memiliki pH yang masih

aman dikonsumsi. Waktu fermentasi tidak menunjukkan adanya pengaruh terhadap persentase penangkapan radikal DPPH justru

nilai persentasenya stabil walaupun pada hari ke – 15 menunjukkan penurunan aktivitasnya.

Tabel. 3 Hasil analisis nilai rata-rata pH dan Persentase Penangkapan Radikal DPPH (%P) Teh Hijau Kombucha berdasarkan variasi waktu fermentasi yang optimal

Waktu Fermentasi	Hasil Pengukuran	
	pH ( $\bar{x} \pm SD$ )	%P ( $\bar{x} \pm SD$ )
Hari ke – 1	3,09 ± 0,021	90,835 ± 0,000
Hari ke – 3	3,07 ± 0,014	90,631 ± 0,000
Hari ke – 5	3,01 ± 0,007	91,853 ± 0,000
Hari ke – 7	2,97 ± 0,035	91,140 ± 1,008
Hari ke – 10	2,93 ± 0,028	91,853 ± 0,286
Hari ke – 15	2,75 ± 0,007	91,445 ± 0,286

Keterangan :  $\bar{x}$  = nilai rata – rata, %P = Persentase Penangkapan Radikal DPPH, SD = Standar Deviasi.

**KESIMPULAN**

Aktivitas antioksidan yang optimal pada teh hijau kombucha dilihat berdasarkan pH aman untuk dikonsumsi, pada hasil penelitian menunjukkan bahwa dihari ke – 1 sampai dengan hari ke – 5 teh hijau kombucha memiliki aktivitas antioksidan yang optimal dengan persentase nilai rata-rata penangkapan radikal DPPH sebesar 90,835 dihari ke - 1, 90,631 dihari ke – 3 dan 91,853 dihari ke – 5 dengan nilai pH rata-rata > 3,00

**DAFTAR PUSTAKA**

Anantaboga, J. 2012. *Tangkal Seabrek Penyakit dengan Teh Hijau*. Jogjakarta : Diva Press

Aryadnyani, N.P. 2012. *Peningkatan Waktu Fermentasi Kombucha Tea Meningkatkan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamases (Esbl) Secara In Vitro*. Denpasar : Universitas Udayana.

Cahyani, D.I., 2015. *Pengaruh Penambahan Teh Hijau terhadap Aktivitas Antioksidan dan Kadar Protein Minuman Fungsional Susu Kedelai dan Madu*. Semarang : Universitas Diponegoro

Fardiaz. 1988. Fisiologi Fermentasi. PAU IPB bekerja sama dengan lembaga Sumberdaya Informasi IPB. (23) : 15-16

- Goh, W.N., Rosma, A., Kaur, B., Fazilah, A., Karim, A.A and Bhat, R. 2012. Fermentation of Black Tea Broth (Kombucha): I. Effects of Sucrose Concentration and Fermentation Time on Yield of Microbial Cellulose. *International Food Reaserch Journal*. 19 (1): 109-117.
- Jasman, I D and Widiyanto, D. 2012. Selection of Yeast Strains for Ethanol Fermentation of Glucose-Fructose-Sucrose Mixture. *Journal of Biotechnology* 17(2) : 114-120.
- Jaya, I. G. N. I. P., Leliqia, N. P. E., dan Widjaja, I. N. K. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Dpph Ekstrak Produk Teh Hitam (Camellia Sinensis (L.) O.K.) Dan Gambir (Uncaria Gambir (Hunter) Roxb) Serta Profil Klt-Densitometernya. *Jurnal Farmasi Udayana*. 1 (1) : 86-101.
- Jayabalan, R., Subathradevi, P., Marimuthu, S., Sathishkumar, M and Swaminathan, K. 2008. Changes in Free-Radical Scavenging Ability of Kombucha Tea during Fermentation. *Food Chem.* (109) : 227-234.
- Suhardini, P.N., dan Zubaidah, E. 2016. Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha Dari Berbagai Jenis Daun Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 4 (1) : 221-229.
- Sukmawati, P.P.A., Ramona, Y., dan Leliqia, N.P.E. 2013. Penetapan Aktivitas Antioksidan Yang Optimal Pada Teh Hitam Kombucha Lokal Di Bali Dengan Variasi Waktu Fermentasi. *Jurnal Farmasi Udayana*. 2 (1) : 25-29.
- Talawat, S., Ahantharik, P., Laohawiwattanukul, S., Premsuk, A., and Ratanapo, S. 2006. *Efficacy of Fermented Teas in Antibacterial Activity. Departement of Biochemistry.* Bangkok : Faculty of Science Kasetsart University.
- Wistiana, D., Dan Zubaidah, E. 2015. Karakteristik Kimiawi Dan Mikrobiologis Kombucha Dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 3(4) : 1446-1457.



## CHARACTERIZATION AND ANALYSIS KOMBUCHA TEA ANTIOXIDANT ACTIVITY BASED ON LONG FERMENTATION AS A BEVERAGE FUNCTIONAL

Maulina Nurikasari, Yenny Puspitasari, Retno Palupi Yoni Siwi  
STIKes Surya Mitra Husada Kediri

[molly.gommez@gmail.com](mailto:molly.gommez@gmail.com), [yenny\\_puspita80@yahoo.co.id](mailto:yenny_puspita80@yahoo.co.id), [palupi.siwi@gmail.com](mailto:palupi.siwi@gmail.com)

**Background:** Kombucha is a symbiosis between bacteria (*Acetobacter*) and yeast (*Saccharomyces*), in English abbreviated SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*). SCOBY in this research will be fermented using green tea media, to make kombucha tea product. Kombucha tea content is very beneficial for health, such as vitamin B1 (thiamine), vitamin B2 (riboflavin), vitamin B3 (niacin), vitamin B12 (cyanocobalamin), vitamin C, acetic acid, amino acids, glucuronic acid, lactic acid and antioxidants. Product characteristic is needed to produce good product quality.

**Method:** The researchers used experimental studies and used the RAL method by varying the length of fermentation of kombucha tea.

**Result:** The result of characterization, kombucha tea pH the longer the fermentation time decreases, the longer the fermentation time the more bright, the weight of cellulose produced SCOBY more fermentation time increases weight, the reduction of sugar content the longer the fermentation time will decrease. The optimum antioxidant activity was obtained on the 7th day of fermentation of 93.79%.

**Conclusion:** Based on the results and the above discussion can be concluded, the color will be brighter with increasing length of fermentation, as well as the weight will increase with the longer fermentation. In contrast to the pH and sugar reductions the longer the fermentation time will decrease. The antioxidant activity had an optimum point on 7th day fermentation of 93.79% and will decrease with increasing fermentation time.

**Keywords:** kombucha Tea Recipe; Characteristic; Antioxidant; Long Fermentation

### INTRODUCTION

Kombucha tea is the result of fermentation of sweetened tea liquid by microorganisms from bacterial and yeast groups. The combination of *Acetobacter xylinum* and yeast bacteria is *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Saccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces* sp and several types of yeast (*Torulopsis* sp) (Aloulou et al, 2012). Kombucha culture hereinafter called SCOBY (*Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast*).

The yeast cells will hydrolyze sucrose to form glucose and fructose for ethanol production, while the bacteria will convert glucose to form gluconic acid and fructose will form acetic acid. *Acetobacter* sp in kombucha culture oxidizes ethanol to acetaldehyde further into acetic acid. The accumulation of each metabolite in addition to form glucuronic acid, lactic acid, vitamins, amino acids, antibiotics, and other substances that are beneficial to health (Jayabalan et al., 2008) and specific scented. With long fermentation time it is possible to form a better composition compared to before fermentation. This study aims to determine the content of

Vitamin C and antioxidant activity of different fermentation time, to obtain kombucha tea containing Vitamin C and the most optimum antioxidant activity.

Health problems have an important role in human life and become one of the primary needs. Free radicals will make our body cells easily damaged and unable to function properly. Vitamin C in Kombucha tea is an important compound necessary to boost the immune system. Vitamin C can function as an antioxidant that can repair body cells and skin tissue damaged by free radicals. Antioxidants are useful for neutralizing free radicals (harmful particles formed as byproducts of metabolic processes, can damage genetic material and damage the immune system), inhibit the growth of cancer cells and reduce the accumulation of cholesterol in the blood and accelerate the removal of cholesterol through the feces.

## METHOD

Researchers used experimental research that is by varying the length of fermentation in Kombucha tea making. In this study to determine the optimum antioxidant activity based on the fermentation length of the authors using Completely Randomized Design (RAL), because this research is conducted indoors with uniform or controllable conditions, environmental conditions, tools, materials, and homogeneous media (Hanafiah, 2008; Siyoto & Sodik, 2015)

The study was conducted with 4 treatments and 1 control, each treatment and control was repeated 3 times. Control with 1 day fermentation, the first treatment is fermentation 3 days, the second treatment is fermentation 5 days, the third treatment is fermentation 7 days and the fourth treatment is fermentation 9 days,

place peneletian at Biomedical Laboratory STIKes Surya Mitra Husada Kediri. .

The materials used in this study are Kombucha culture (obtained from [www.wikikombucha.com](http://www.wikikombucha.com)), Sugar Sand (Gulaku Brand), Green Tea, kombucha vinegar. The tool used in this research is stainless steel pan, stove, beaker glass, stirrer, pH meter, strainer, white cloth, measuring cup, scales, organoleptic test form. Making kombucha tea 1000 ml of aquades was boiled for 10 minutes, added sugar (10% b/v) stirred until the sugar completely dissolved, then added green tea leaf (5% b/v). The tea solution is then filtered off, separated from the pulp and cooled to room temperature; the tea solution is placed in a measuring cup; added kombucha culture (10% b/v) to tea solution; tea solution containers that have been added kombucha culture are sealed with a clean cloth that has been sterilized (used cloth to prevent contamination of foreign materials, but air can still enter); fermented at room temperature (1, 3, 5, 7, 9, 11 days).

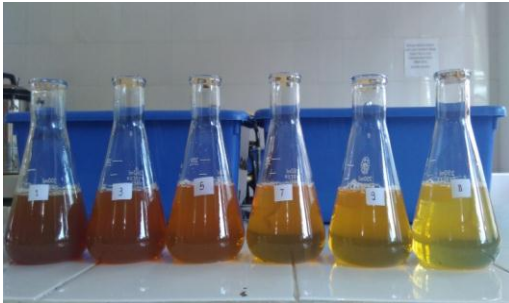
## RESULT

The fermentation process in this study is divided into 2, namely fermentation of alcohol and acetic acid. The yeast involved in kombucha fermentation is *Saccharomyces cereviceae*, whereas the acetic acid bacteria is *Acetobacter xylinum*. The yeast will break the sugar into alcohol, and the acetic acid bacteria will oxidize the alcohol to acetic acid.

### Characterization of Kombucha Tea

#### 1. Kombucha Tea Color

At the beginning of kombucha tea fermentation is dark brown, with increasing length of fermentation of dark brown color becomes lighter (figure 1). This is due to the ability of microbra to do the color degradation.



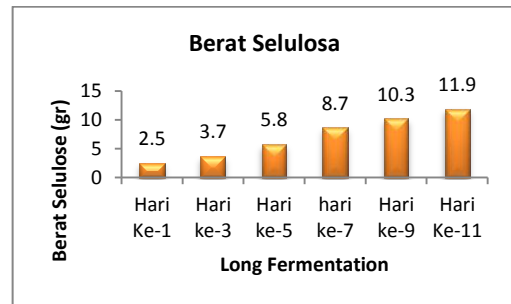
**Figure 1.** The color difference in kombucha tea based on fermentation time

Color degradation occurs because the microbes that utilize the total soluble solid as energy so that over time the solvent in the media will run out and the liquid becomes more clear or colorless (Nainggolan, 2009).

## 2. Cellulose weight generated SCOBY

The duration of fermentation influences the weight of cellulose produced by scoby on kombucha tea fermentation, this can be seen in Figure 2 which shows the increasing length of fermentation increasing the weight of cellulose. The initial weight of scoby prior to inclusion in the green tea substrate was 2.3 grams, at 1-day fermentation of cellulose weight to 2.5gr, day 2.7gr, 5th day 5.8gr, 7th day 8.7gr , day 9th 10.3gr and 11th day 11,9gr. The longer the fermentation time the weight of cellulose will increase, this is because during the process of fermentation occurs breakdown of sugar substances into simpler components of glucose and

fructose and the formation of carbon components of cellulose forming, so that in the long period of fermentation, there is accumulation of fermentation of sugar continuously.



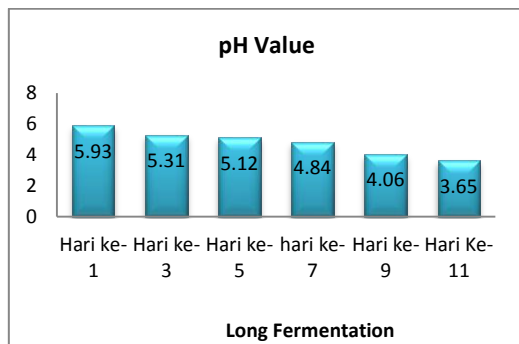
**Figure 2.** Cellulose weight generated SCOBY based on fermentation time

The process of extracellular cellulose formation by *Acetobacter xylinum* through aerobic process by using glucose as a substrate. Respiration is required for biological oxidation processes using oxygen molecules as oxidizing agents. *Acetobacter xylinum* can utilize fructose as a sugar source to synthesize cellulose. In the early formation, cellulose will first be produced in an unstructured medium, as a cell-released material, composed of randomly distributed molecules (Jayabalan, 2014).

## 3. pH value

From the data in Figure 3 it can be seen that the pH value on the 1st fermentation day (pH 5.93) gradually decreased on 3rd day fermentation (pH 5.31), 5th day (pH 5.12), day to-9 (pH 4.06) and day 11 (pH 3.65). The results of Pratiwi et al (2011) study about the effect of fermentation time on the physical and chemical properties of kombucha from Seaweed substrate yielded the data that is pH value

decreased from day 0 to day 16, from pH 4.89 decreased to pH 3, 09. The results of research conducted Sari (2014) also get the pH results decreased from the fermentation of day 4 to day 12, ie from pH 5.5 down to pH 3.52. More fermentation time will decrease the pH (acidity level ) in kombucha tea, this causes the kombucha tea more acidic taste.



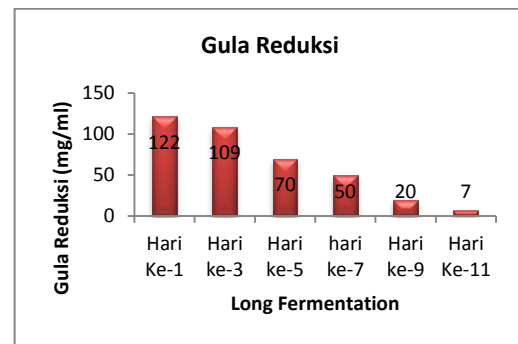
**Figure 3.** The pH value of kombucha tea based on fermentation time

The decline in kombucha tea pH occurs because during the fermentation process the yeast produces sugar into ethanol and by acetate bacteria is converted into organic acids, such as acetic acid and gluconic acid and some concentrations of organic acids leads to a decrease in the pH of the fermentation medium (Afifah, 2010). Nainggolan (2009) in his research states, the longer the fermentation takes place the concentration of acetic acid will be higher, this causes the pH value of kombucha tea tends to decrease.

#### 4. 4. Sugar reduction levels

The decrease in sugar content (figure 4) from the 1st day of fermentation by 122mg / ml continued to decline until the fermentation of the 11th day was 7mg / ml. reduction of reducing sugar explains that each microbe needs sugar as a carbon source,

because the sugar on the medium will be used by microbes as nutrients which will then be converted to alcohol and CO<sub>2</sub>. The CO<sub>2</sub> gas further reacts with water vapor and forms carbonic acid. In the process of fermentation of this sugar, yeast very active role in the decomposition of sugar into CO<sub>2</sub> and organic acids and other components (Pratiwi, 2011).



**Figure 4.** Sugar Levels Kombucha tea reduction based on fermentation time

Basically in making kombucha the most important is sugar, because sugar is the source of food for kombucha microbial culture. The type of sugar as a carbon source that is often used in making kombucha is sugar. When kombucha tea fermentation process, bacteria will convert glucose into various types of acids, vitamins, and alcohols that are beneficial to the body. This glucose is derived from the inversion of sucrose by yeast producing glucose and fructose.

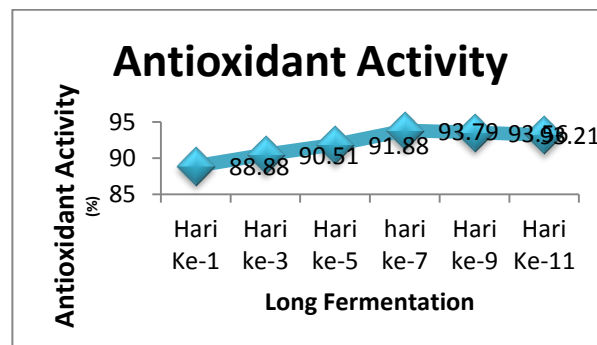
In the preparation of ethanol by yeast and cellulose by *Acetobacter xylinum*, glucose is converted to gluconic acid through the phosphate pentose pathway by acetic acid bacteria, mostly fructose is metabolized to acetic acid and a small amount of gluconic acid. Glucose here as a substrate for cell

growth and product formation (acetic acid).

The result of Marwati's research, et al (2013) about the effect of sugar concentration and kombucha starter on kombucha tea quality obtained by kombucha tea with best taste quality obtained from combination treatment of 20% sugar concentration with 20% kombucha starter concentration. The concentration of sugar and starch concentration of kombucha had significant effect on kombucha tea flavor characteristic.

### Antioxidant Activity

The antioxidant activity of kombucha tea with green tea substrate was done using DPPH method. DPPH is a free radical that is stable at room temperature that receives electrons or hydrogen and forms a stable molecule. The absorption of violet color was performed by absorbance measurement at 517 nm wavelength using visible spectrophotometer and compound as positive control. When all DPPH has binds to the antioxidant compounds in kombucha tea then the solution will lose its purple color and turn into a bright yellow color (Nur et all, 2013).



**Figure 5.** Long fermentation of kombucha tea antioxidant activity

he antioxidant activity of kombucha tea increases with increasing fermentation time (figure 5). The increase in antioxidant activity on day 1 (88.88%) and day 3 (90.51%) was 1.63%, then in the 5th day (91.88%) increased by 1.37 %, and optimum antioxidant activity in 7th day fermentation (93.79%). The increase of antioxidant activity on the 7th day is the optimum condition based on fermentation time, this can be seen with the decrease of anti oxidant activity on day 9 (93,56%) and decrease at day 11 (93,21% ).

Agus Suprijono, et al (2010) also conducted research on antioxidant activity in kombucha tea on black tea substrate, antioxidant activity on green tea kombucha showed optimum on fermentation day 7

and decreased antioxidant activity on fermentation day 10th day.

Suhardini and Zubaidah (2016) study, analyzed antioxidant activity of kombucha tea using leaf substrate containing phenol obtained optimum antioxidant activity of 88.24% up to 92.97% during fermentation day 8 and decreased antioxidant activity on day to day -14.

Wulandari (2014), conducted research on antioxidant activity of kombucha tea using coffee leaf substrate, obtained optimum antioxidant activity result on fermentation day 8 (89,51%) and decreased antioxidant activity on 12th day fermentation (53,43% ).

Increased antioxidant activity in kombucha tea is due to the metabolism of microorganisms in kombucha during the fermentation process (Goh et al, 2012). Antioxidant activity decreased after fermentation day 7, this is because acid atmosphere causes phenolic compounds become more stable and difficult to release proton that can bind to DPPH, so that antioxidant activity decreased (Ayu et al., 2013). Consuming fermented kombucha for too long can also be harmful to health because the high acetic acid content in kombucha can cause acidosis (Greenwelt et al, 2006)

### CONCLUSION

Based on the results and the above discussion can be concluded, the color will be brighter with increasing length of fermentation, as well as the weight will increase with the longer fermentation. In contrast to the pH and sugar reductions the longer the fermentation time will decrease. The antioxidant activity had an optimum point on 7th day fermentation of 93.79% and will decrease with increasing fermentation time

### REFERENCE

- Aloulou et al. 2012. Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *Complementary and Alternative Medicine.*, 12:63.
- Ayu S, Yan R, Eka L. 2013. Penetapan Antioksidan pada Teh Hitam Kombucha Lokal di Bali dengan Waktu Fermentasi. Bali: Universitas Udayana.
- Goh, W.N., A. Rosma, B. Kaur, A. Fazilah, A.A Karim, and R. Bhat. 2012. Fermentation of Black Tea Broth (Kombucha): I. Effects of Sucrose Concentration and Fermentation Time on Yield of Microbial Cellulose
- Greenwalt, Ledford and Steinkraw. 2006. Determination and Characterization of The Microbial Activity of The Fermented Tea Kombucha. New York : Department of Food Science Cornell University
- Jayabalan Rasu et all, 2014, A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity and Tea Fungus, *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, Vol. 13, h.538-550.
- Nur Md A, Bristi NJ, and Rafiquzzaman Md. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2013; 21:143–152
- Siyoto, S. & Sodik, M.A. 2015. *Dasar Metodologi Penelitian*. Yogyakarta: Literasi Media Publishing.  
<https://doi.org/10.5281/zenodo.1117422>
- Soekarto. ST. 1985. *Penilaian Organoleptik Untuk Pangan Dan Hasil Pertanian*. Bharatara Karya Akasara. Jakarta.
- Suhardini, PN dan Zubaidah Elok, 2016, Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha Dari Berbagai Jenis Daun Selama Fermentasi, *Jurnal Pangan dan Argoindustri* Vol. 4 No. 1 p.221-229
- Suprijono Agus, dkk, 2010, Pengaruh Fermentasi Kultur Kombucha

Terhadap Aktivitas Antioksidan Infus Daun Teh Hitam Dengan Metode DPPH, Media Farmasi Indonesia, Vol. 6, N0. 2

Vitas J, Malbasa R, Grahovac J, Loncar E, 2013, The Antioxidant Activity Of

Kombucha Fermented Milk Products With Stinging Nettle and winter Savory, Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly, Vol. 19, No. 1, h. 129-139

## PENGARUH JENIS TEH TERHADAP KARAKTERISTIK TEH KOMBUCHA

**Ketut Ita Purnami<sup>1)</sup>, A.A.G.N. Anom Jambe<sup>2)</sup>, Ni Wayan Wisaniyasa<sup>2)</sup>**

<sup>1)</sup>Mahasiswa Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana

<sup>2)</sup>Dosen Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana

Email: itapurnami@gmail.com

### ABSTRACT

*This study aims to know the influence of tea type on the characteristics of kombucha tea and determine the kind of tea that can produce kombucha tea with the best characteristics. This study used Completely Randomized Design (CRD) with the treatment of four types of tea were white tea, green tea, black tea and mixed tea (white tea, green tea and black tea). Each treatment was repeated four times to obtain 16 experimental units. The result of research showed that the best kombucha tea was white tea with characteristics: antioxidant capacity 807.86 ppm GAEAC, total acid 3.58%, pH 4.14, total dissolved solids 10.00<sup>0</sup>Brix, and total sugar 2.08 mg/100g, color (hedonic) rather like, aroma (hedonic) neutral, aroma (scores) kinda typical kombucha tea, taste (hedonic) neutral, taste (scores) tasted kombucha tea, overall acceptance rather like.*

*Keywords: kind of tea, kombucha, characteristics*

### PENDAHULUAN

Teh telah dikenal luas sebagai minuman yang baik untuk kesehatan (Hartoyo, 2003). Negeri Tiongkok menjadi tempat lahirnya teh, mereka menikmati rasa yang menyenangkan dari sari daun teh dan mulai dijadikan sebagai minuman. Tapi dalam sejarah Bali, jamur kombucha sudah ada sejak zaman kuno. Di Bali jamur kombucha pertama kali dikenalkan oleh Putri Kang Cing Wie asal Cina yang datang ke Pulau Bali. Teh kombucha dapat diperoleh dengan memeras larutan teh manis yang ditambahkan jamur kombucha. Jamur kombucha penghasil cairan kombucha adalah campuran dari beberapa mikroba berupa bakteri dan ragi (Hartoyo, 2003). Di Indonesia, sampai saat ini belum terdapat industri yang memproduksi dan menjual teh kombucha secara luas. Oleh karena itu, potensi pengembangan teh kombucha sangat besar.

Adapun jenis-jenis teh yang dikenal antara lain; teh putih, teh hijau, teh hitam. Teh putih saat diseduh warna air hanya sedikit berubah menjadi kekuningan. Teh hijau diolah tanpa proses fermentasi (oksidasi enzimatis), teh hitam mengalami proses fermentasi. Keunggulan teh kombucha dibandingkan cairan teh biasa adalah kandungan asam-asam organik dan beberapa senyawa seperti vitamin dan asam amino. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Purwaning (2010) dan Rahayu (2005) menggunakan teh kombucha terhadap tikus putih menunjukkan penurunan kadar kolesterol. Pembuatan teh kombucha yang dibuat dari berbagai variasi daun yaitu daun salam, daun jambu, daun sirih, daun sirsak, daun kopi, dan daun teh, menyatakan bahwa teh kombucha terbaik adalah yang terbuat dari daun teh, karena tannin yang terkandung di dalam daun teh paling tinggi sehingga



mempengaruhi tingkat antioksidan media pertumbuhan jamur kombucha (Suhardini, 2015).

Seluruh jenis teh yang ada berasal dari satu jenis tanaman teh melalui proses pengolahan tertentu yang akan memberikan ciri khas pada teh tersebut. Proses pengolahan teh menjadi teh kombucha dengan perbedaan konsentrasi teh, konsentrasi stater (jamur kombucha), lama fermentasi dan jenis teh dapat mengakibatkan adanya perbedaan rasa, aroma, komposisi dan jumlah kandungan kimia yang terkandung didalamnya. Berdasarkan latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh jenis teh terhadap karakteristik teh kombucha. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh jenis teh terhadap karakteristik teh kombucha dan mengetahui jenis teh yang dapat menghasilkan teh kombucha dengan karakteristik terbaik.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Pangan dan Laboratorium Analisis Pangan, Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Gedung Agrokomplek Universitas Udayana, Jalan P.B. Sudirman, Denpasar, Bali. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2016 - Januari 2017.

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam melaksanakan penelitian ini, antara lain : pengaduk teh kayu, toples kaca, penyaringan plastik, botol kaca, Waskom kaca, kain kasa, karet gelang, sendok kayu, timbangan analitik (*Shimodzu ATY 224*), pH meter, kertas saring, tabung reaksi (*Pyrex*), corong plastik, plastik 1 kg, kulkas, vortex, handrefraktometer, waterbath dan *soxhlet* (*Sybron 2200*).

Adapun bahan yang digunakan dalam melaksanakan penelitian ini, antara lain: teh putih, teh hijau, dan teh hitam, teh campuran dicampur sendiri (teh putih, teh hijau, teh hitam) yang diperoleh dari (Toko *Brew Me* merk Bali *Tea Gallery*). Gula pasir (merk Gulaku) yang diperoleh dari (Toko Karunia Dewata), air diperoleh dari (Minimarket 828) dan stater kombucha diperoleh dari (Jalan Danau Tamblingan, Sanur, Bali). Bahan kimia yang di gunakan dalam melakukan analisis meliputi aquades, asam galat, methanol, DPPH, indikator *phenolphthalein* (PP), nelson A, nelson B, Arsenomolibdat, HCl 4 N, NaOH 50%, standar glukosa dan NaOH 0,1 N.

### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan jenis teh yang digunakan, yaitu : A1 = Teh putih 50 gram, A2 = Teh Hijau 50 gram, A3 = Teh Hitam 50 gram, A4 = Teh Campuran dari teh putih 16,6 gram, teh hijau 16,6 gram dan teh hitam 16,6 gram. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4 kali sehingga diperoleh 16

unit percobaan. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan sidik ragam dan apabila terdapat pengaruh perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan (Gomes dan Gomes, 1995).

### **Variabel yang Diamati**

Variabel yang diamati pada penelitian ini meliputi : kapasitas antioksidan (Chan *et al.*, 2007 dalam Almey *et al.*, 2010), total asam (Sudarmadji dkk, 1984), derajat keasaman (pH) (AOAC, 1995), total padatan terlarut (TPT) (AOAC, 1995), kadar gula (Nelson, 1944), dan evaluasi sensori (Septyaningsih *et al.*, 2010).

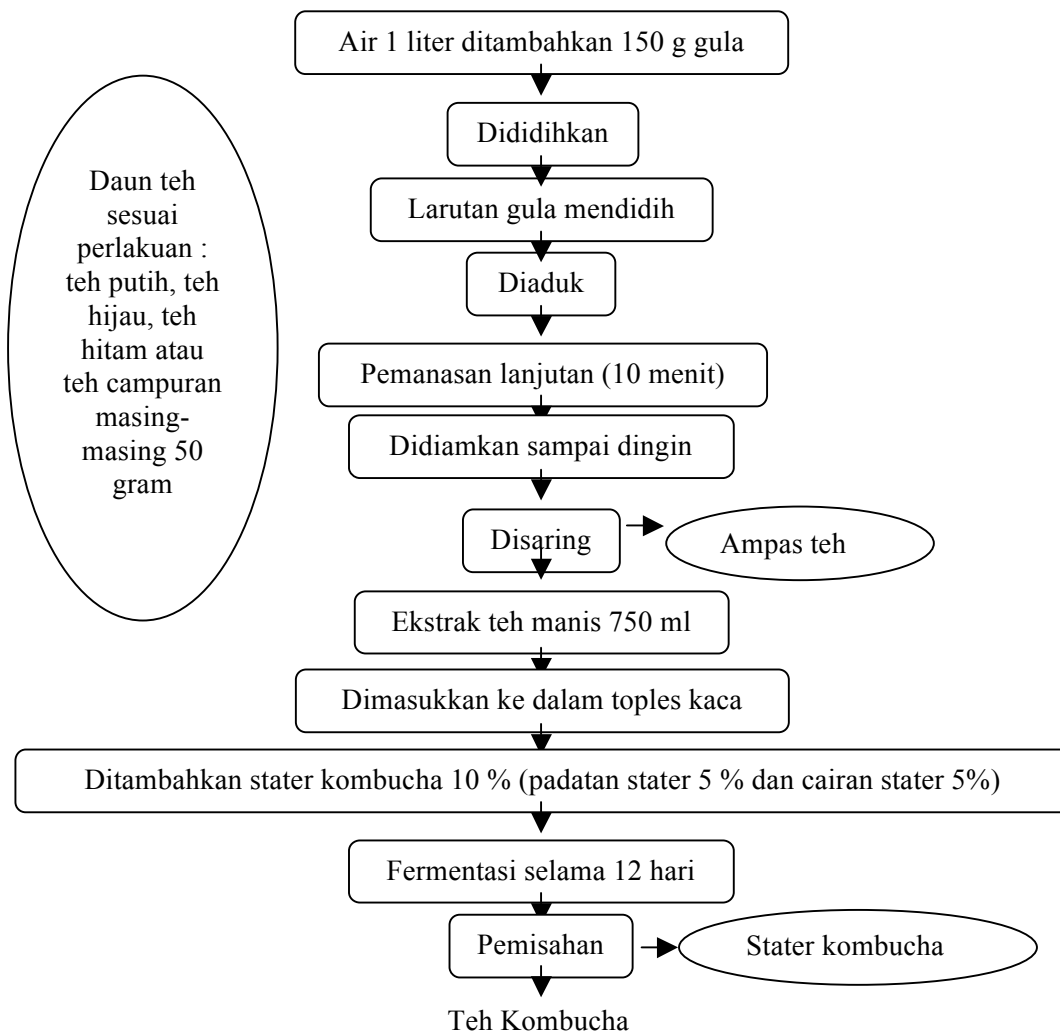
### **Pelaksanaan Penelitian**

#### **1. Pembuatan Teh Kombucha**

Persiapan bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan teh kombucha yaitu teh putih, teh hijau, teh hitam, air, dan gula pasir. Bahan yang digunakan kemudian ditimbang

sesuai dengan formulasinya. Proses pembuatan teh kombucha dapat dilihat pada Gambar 1.

Pembuatan teh kombucha dimulai dengan disiapkan panci yang berisi air dan gula dipanaskan menggunakan kompor dengan perbandingan air dan gula ( 1 liter : 150 gram ) yang menghasilkan larutan gula. Larutan gula yang telah dipanaskan ditambahkan daun teh sesuai perlakuan sebanyak 50 gram lalu diaduk, dilakukan pemanasan 10 menit dan didinginkan kemudian disaring untuk menghilangkan ampas tehnya maka, dihasilkan ekstrak teh manis 750 ml yang telah disaring. Setelah itu, dilanjutkan dengan penuangan pada toples kaca dan ditambahkan stater kombucha 10% (padatan stater 5% dan cairan stater 5%) lalu difermentasi pada suhu ruang selama 12 hari. Setelah 12 hari, dilakukan pemisahan minuman teh kombucha dengan stater kombucha.



Gambar 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Teh Kombucha (Rinihapsari dan Catur, 2008 yang dimodifikasi)

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil analisis kapasitas antioksidan, total asam, pH, total padatan terlarut, dan total gula teh kombucha disajikan pada Tabel 1.

**Kapasitas Antioksidan**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap kapasitas antioksidan teh kombucha. Tabel 1 menunjukkan kapasitas antioksidan teh kombucha berkisar antara 793,64 ppm

GAEAC sampai dengan 807,86 ppm GAEAC. Kapasitas antioksidan tertinggi diperoleh dari teh kombucha yang menggunakan jenis teh putih yaitu 807,86 ppm GAEAC dengan kapasitas antioksidan terendah terdapat pada teh kombucha berbahan teh hitam yaitu 793,64 ppm GAEAC.

Tabel 1 menunjukkan kapasitas antioksidan teh hitam paling rendah dibandingkan kapasitas antioksidan teh putih,

teh hijau dan teh campuran. Penelitian Lee dan Hoo (2001) mengungkapkan bahwa kapasitas antioksidan teh dapat dipengaruhi oleh komposisi dan konsentrasi senyawa antioksidan yang dikandung teh. Pucuk pertama daun teh, kandungan katekinnya lebih

tinggi dibanding daun teh yang lainnya. Teh putih ini memiliki kandungan katekin yang tinggi karena semakin muda daun akan semakin tinggi pula kadar katekinnya. Itu sebabnya, kandungan katekin dalam teh putih dan teh hijau lebih banyak daripada teh hitam.

Tabel 1. Nilai Rata-Rata Kapasitas Antioksidan, Total Asam, pH, Total Padatan Terlarut, dan Total Gula Teh Kombucha.

Perlakuan Teh Kombucha	Nilai rata-rata				
	Kapasitas Antioksidan (ppm GAEAC)	Total Asam (%)	pH	Total Padatan Terlarut (TSS) ( <sup>0</sup> Brix)	Total Gula (mg/100g)
A1 (teh putih)	807,86 a	3,58 a	3,14 b	10,00 a	2,08 a
A2 (teh hijau)	801,48 b	3,26 b	3,44 a	10,25 a	2,98 a
A3 (teh hitam)	793,64 d	3,22 b	3,42 a	9,75 a	3,13 a
A4 (teh campuran)	796,63 c	3,35 b	3,37 a	9,75 a	2,89 a

Keterangan : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan sangat nyata (P<0,01).

**Total Asam**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh sangat nyata (P<0,01) terhadap total asam teh kombucha. Tabel 1 menunjukkan total asam teh kombucha berkisar antara 3,22% sampai dengan 3,58%. Total asam tertinggi diperoleh teh kombucha berbahan teh putih yaitu 3,58%, sedangkan total asam terendah diperoleh dari teh hitam yaitu 3,22%.

Total asam pada teh kombucha menentukan cita rasa teh kombucha. Jenis teh yang berbeda pun mempengaruhi kadar total asam pada teh kombucha. Tabel 1 memperlihatkan bahwa semakin cepat fermentasi berlangsung total asam semakin

meningkat. Semakin tinggi total asam, pH semakin turun. Menurut Wood dan Lass (1985) menyatakan bahwa asam asetat mencapai puncaknya setelah 5 sampai 6 hari kemudian turun. Naland (2004) menyatakan menambahkan, teh kombucha menghasilkan asam-asam organik antara lain asam glukoronat, asam asetat, asam glukonat, asam kondrotin sulfat, asam hyaluronik, asam hyaluronidase dan asam amino.

**pH**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh sangat nyata (P<0,01) terhadap pH teh kombucha. Tabel 1 menunjukkan bahwa pH teh kombucha

berkisar antara 3,14 sampai dengan 3,44. pH teh kombucha tertinggi diperoleh dari teh kombucha berbahan jenis teh hijau yaitu 3,44, sedangkan pH teh kombucha terendah diperoleh dari bahan teh putih yaitu 3,14.

Tabel 1 menunjukkan semakin meningkat kandungan asam suatu bahan maka nilai pH akan semakin turun. pH teh kombucha paling rendah pada teh putih kemungkinan karena konsentrasi asam asetat yang paling tinggi dibuktikan dari nilai total asam yang paling tinggi. Penurunan pH dalam fermentasi akan mendukung kehidupan bakteri *Acetobacter xylinum* dalam starter kombucha untuk melangsungkan aktivitas metabolisme asam asetat yang terlarut akan terdisosiasi untuk melepaskan proton-proton bebas yang menurunkan pH larutan (Wistiana dan Zubaidah, 2015).

#### **Total Padatan Terlarut**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap total padatan terlarut teh kombucha. Tabel 1 menunjukkan total padatan terlarut teh kombucha berkisar antara 9,75% sampai dengan 10,25%.

Total padatan terlarut adalah ukuran dari jumlah material yang dilarutkan dalam air.

Padatan terlarut yang terdiri dari karbohidrat yang larut dalam air yaitu gula-gula sederhana monosakarida dan disakarida. Bahan ini dapat mencakup karbonat, bikarbonat, klorida, sulfat, fosfat, nitrat, kalsium, magnesium, natrium, ion-ion organik. Pada dasarnya total padatan terlarut suatu bahan yang meliputi gula reduksi, gula non reduksi, asam-asam organik, pektin dan protein.

#### **Total Gula**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap total gula teh kombucha yang dihasilkan. Mikroba membutuhkan gula sebagai sumber karbon. Gula pada media akan digunakan oleh mikroba sebagai nutrisi yang kemudian akan diubah menjadi alkohol,  $CO_2$  dan asam karbonat (Suprpti, 2003 dalam Silaban, 2005). Energi diperlukan untuk mempertahankan kehidupan stater kombucha dan untuk perkembangbiakan stater serta untuk pergerakan organisme yang bersifat motil. Menurut Rahayu dan Kuswanto (1987), total gula semakin menurun dikarenakan khamir (*Saccharomyces cereviseae*) menguraikan sukrosa menjadi alkohol sehingga kadar alkohol teh kombucha semakin meningkat.

**Evaluasi Sensoris**

Evaluasi sensori teh kombucha dilakukan dengan uji hedonik terhadap warna, aroma, rasa, penerimaan keseluruhan dan uji skoring

terhadap aroma, dan rasa. Nilai rata-rata penilaian sensoris terhadap karakteristik teh kombucha disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai rata-rata penilaian sensoris terhadap karakteristik teh kombucha.

Perlakuan Teh Kombucha	Warna	Aroma		Rasa		Penerimaan Keseluruhan
	Hed	Hed	Skor	Hed	Skor	Hed
A1 (teh putih)	4,60 c	4,00 a	3,40 a	4,40 ab	3,75 b	4,50 b
A2 (teh hijau)	5,60 ab	4,30 a	3,40 a	4,25 b	3,80 b	4,45 b
A3 (teh hitam)	4,85 bc	4,30 a	3,55 a	3,75 b	3,65 b	4,35 b
A4 (teh campuran)	5,95 a	4,85 a	3,80 a	5,20 a	4,30 a	5,45 a

Keterangan : Nilai rata-rata yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,01$ ); Hed = Hedonik, Skor = Skoring

**Warna**

Hasil analisis ragam terhadap uji hedonik menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap warna teh kombucha (uji hedonik). Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata tingkat kesukaan panelis terhadap warna teh kombucha berkisar antara 4,60 (agak suka) sampai dengan 5,95 (suka). Nilai rata-rata tertinggi diperoleh dari teh campuran yaitu 5,95 (suka), sedangkan nilai rata-rata terendah diperoleh dari teh putih yaitu 4,60 (agak suka). Winarno dalam Oryza (2006) mengatakan bahwa penilaian mutu bahan makanan yang umumnya bergantung pada beberapa faktor antara lain warna, aroma, rasa, penerimaan keseluruhan. Dimana teh kombucha putih memiliki warna khas teh putih yaitu putih keperakan, teh kombucha hijau memiliki warna khas teh hijau yaitu hijau

keemasan. Teh kombucha hitam berwarna khas dari teh hitam yang memiliki warna merah dibandingkan teh hijau yaitu hijau keemasan dan teh kombucha campuran memiliki warna merah pekat hampir sama dengan warna teh kombucha hitam. Warna khas masing-masing teh berbeda karena terdapat perbedaan pada saat proses pengolahan pucuk teh tersebut.

**Aroma**

Berdasarkan uji hedonik, hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap aroma teh kombucha. Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata tingkat kesukaan panelis terhadap aroma teh kombucha berkisar antara 4,00 (netral) sampai dengan 4,85 (agak suka). Berdasarkan uji skoring, hasil analisis

ragam menunjukkan bahwa jenis teh tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap aroma teh kombucha. Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata tingkat kesukaan panelis terhadap aroma teh kombucha berkisar antara 3,40 (agak tidak terasa teh kombucha) sampai dengan 3,80 (khas teh kombucha).

Aroma juga menjadi faktor penentu daya terima panelis (Khasanah, 2003). Aroma yang terdapat pada teh kombucha disebabkan karena adanya asam-asam organik dan aroma yang ditimbulkan pada daun teh itu sendiri. Aroma pada teh kombucha juga disebabkan oleh senyawa-senyawa volatil antara lain alkohol, asam asetat, dan asam-asam organik yang terbentuk sehingga menimbulkan aroma asam yang khas.

### **Rasa**

Berdasarkan uji hedonik, hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap rasa teh kombucha. Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata tingkat kesukaan panelis terhadap rasa teh kombucha berkisar antara 3,75 (biasa) sampai dengan 5,20 (agak suka). Nilai rata-rata tertinggi diperoleh dari teh campuran yaitu 5,20 (agak suka), sedangkan nilai rata-rata terendah diperoleh dari teh hitam yaitu 3,75 (biasa). Berdasarkan uji skoring, hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap rasa teh kombucha. Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata tingkat kesukaan panelis terhadap rasa teh kombucha berkisar antara

3,65 (terasa teh kombucha) sampai dengan 4,30 (terasa teh kombucha). Nilai rata-rata tertinggi diperoleh dari teh campuran yaitu 4,30 (terasa teh kombucha), sedangkan nilai rata-rata terendah diperoleh dari teh hitam yaitu 3,65 (terasa teh kombucha).

Tingkat kesukaan panelis terhadap rasa paling tinggi didapatkan dari jenis teh campuran dibandingkan jenis teh lainnya. Teh putih cenderung memiliki rasa manis dan lebih ringan pekatnya karena daun teh putih diambil dari pucuk paling muda dibandingkan dengan teh hijau yang memiliki rasa yang kuat dan teh hitam yang memiliki rasa pahit dan sepat. Rasa dari teh campuran merupakan hasil dari keseimbangan dari variasi sensasi rasa yang berasal dari gabungan teh putih, teh hijau dan teh hitam. Hal ini didukung oleh pendapat Chaturvedula dan Prakash (2011), rasa asing adalah rasa yang menyimpang dari rasa khas teh. Hasil teh campuran menghasilkan rasa asing berupa adanya sensasi rasa manis, serta rasa pahit yang cukup kuat yang merupakan karakteristik dari teh campuran dari gabungan teh putih, teh hijau dan teh hitam.

### **Penerimaan Keseluruhan**

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis teh berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap penerimaan keseluruhan (uji hedonik) teh kombucha. Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai rata-rata panelis terhadap penerimaan keseluruhan teh kombucha berkisar antara 4,35 (biasa) sampai dengan 5,45 (agak suka). Nilai rata-rata tertinggi diperoleh dari perlakuan teh

campuran yaitu 5,45 (agak suka), sedangkan nilai rata-rata terendah diperoleh dari teh hitam yaitu 4,35 (biasa). Rata-rata dari penerimaan keseluruhan pada uji sensori menunjukkan kriteria yang berkisar dari biasa hingga agak suka. Penerimaan keseluruhan menunjukkan bahwa teh kombucha dapat diterima dengan cukup baik oleh panelis.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Jenis teh berpengaruh sangat nyata terhadap kapasitas antioksidan, total asam, pH, warna (uji hedonik) dan rasa (uji hedonik) serta berpengaruh tidak nyata terhadap total padatan terlarut, total gula, uji hedonik dan uji skoring aroma dan penerimaan keseluruhan.
2. Berdasarkan analisis karakteristik teh kombucha terbaik adalah yang berbahan baku teh putih dengan karakteristik kapasitas antioksidan 807,86 ppm GAEAC, total asam 3,58%, pH 4,14, total padatan terlarut 10,00<sup>0</sup>Brix, dan total gula 2,08 mg/100g, warna (hedonik) agak suka, aroma (hedonik) biasa, aroma (skoring) agak khas teh kombucha, rasa (hedonik) biasa, rasa (skoring) terasa teh kombucha, penerimaan keseluruhan agak suka.

### Saran

1. Jenis teh yang terbaik untuk membuat teh kombucha adalah teh putih.

2. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui umur simpan teh kombucha.

## DAFTAR PUSTAKA

- Almey, A. 2010. Total Phenolic Content and Primary Antioxidant Activity of Methanolic and Ethanolic Extract of Aromatic Plants Leaves. *International Food Research Journal.*: 17: 1077–1084.
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>th</sup> ed. AOAC International. Gaithersburg. University of Maryland, USA.
- Chaturvedula, V. S. dan I. Prakash. 2011. The Aroma, Taste, Color and Bioactive Constituents of Tea. *Journal of Medicinal Plants Research.*: 5(11): 2110-2124.
- Gomes, K. A. dan A. A. Gomes. 1995. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. UI Press. Jakarta.
- Hartoyo, A. 2003. *Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan*. Kansius. Yogyakarta.
- Khasanah, U. 2003. *Formulasi Karakterisasi Fisiko-Kimia dan Organoleptik Produk Makanan Sarapan Ubi Jalar (Sweet Potato Flakes)*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Lee, K. W. dan L. H. Joo. 2001. Antioxidant Activity of Black Tea vs. Green Tea. Department of Food Science and Technology. School of Agricultural Biotechnology. Seoul National University, Korea.
- Naland, H. 2004. *Kombucha Teh Ajaib Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose *The Journal of Biological Chemistry*. 153: 375-380.



- Oryza, S. D. 2006. Kajian Proses Pembuatan Teh Herbal dari Campuran Teh Hijau (*Camellia sinensis*), Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar, Roxb*), dan Daun Ceremai (*Phyllanthus acidus L. Skeels*). Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Purwaning, A. 2010. Pengaruh Teh Kombucha (*Acetobacter xylinum*) Terhadap Kadar Kolesterol Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). Jurnal Departemen Biologi. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Rahayu, E. S. dan K. R. Kuswanto. 1987. Teknologi Pengolahan Minuman Beralkohol. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Rahayu, T. 2005. Kadar Kolesterol Darah Tikus Putih Setelah Pemberian Cairan Kombucha Per Oral. Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi. Vol. 6 No. 2.
- Rinihapsari, E. dan A. R. Catur. 2008. Fermentasi Kombucha dan Potensinya Sebagai Minuman Kesehatan. Media Farmasi Indonesia. Vol. 3 No. 2.
- Septyaningsih, D., A. Apriyantono dan P. Sari. 2010. Analisis Sensori untuk Industri Pangan dan Agro. IPB Press. Bogor.
- Silaban, M. 2005. Pengaruh Jenis Teh dan Lama Fermentasi Pada Proses Pembuatan Teh Kombucha. Skripsi. Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhandi. 1984. Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Edisi II. Bandung. Penerbit Alumnus.
- Suhardini, P. N. dan E. Zubaidah. 2015. Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha dari Berbagai Jenis Daun Selama Fermentasi. Jurnal Pangan dan Agroindustri. Vol. 4 No. 1.
- Sustrani, L., S. Alam dan I. Hadibroto. 2006. Hipertensi. PT. Gramedia Pustaka Utama : Jakarta.
- Wistiana, D. dan E. Zubaidah. 2015. Karakteristik Kimiawi dan Mikrobiologis Kombucha dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. Jurnal Pangan Dan Agroindustri. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya, Malang.
- Wood, G. R. A. and R. A. Lass. 1985. Cocoa. 4<sup>th</sup> Ed. Fourth Edition. John Wiley and Sons, Inc. New York.

# Aktivitas Antioksidan Teh Kombucha dari Beberapa Varian Teh yang Berbeda

Azrini Khaerah<sup>1</sup>, Fauzan Akbar<sup>2</sup>

Program Studi Pendidikan Biologi, Universitas Muhammadiyah Bulukumba

**Abstrak.** Kombucha adalah sebuah minuman hasil fermentasi yang dilakukan oleh SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast). Substrat dalam pembuatan minuman kombucha dapat menggunakan dedaunan atau bahan yang mengandung senyawa fenolik tinggi, misalnya daun teh, daun kopi, daun sirih, dan sebagainya. Penelitian ini bertujuan untuk membuat 4 varian minuman teh kombucha dan membandingkan aktivitas antioksidan, serta total asam organik dan senyawa fenol dari keempat jenis kombucha tersebut. Dalam penelitian ini digunakan 4 varian teh yang berbeda, yaitu teh hijau (Sosro Heritage), teh hitam (Sosro Heritage), teh putih (Twinings) dan teh oolong (Ti Guan Yin). Dari keempat sampel teh tersebut, masing-masing dibuat menjadi minuman teh kombucha, selanjutnya dianalisis dari segi aktivitas antioksidan, total fenol, dan total asam. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa semakin rendah nilai  $IC_{50}$  maka semakin tinggi aktivitas antioksidan. Dan terjadi peningkatan aktivitas antioksidan pada sampel sebelum dan setelah fermentasi. Dalam penelitian ini kombucha dari teh hijau memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi, dan terlihat bahwa fermentasi oleh SCOBY menyebabkan kandungan antioksidan semakin meningkat. Sedangkan pada pengujian total fenol, juga terlihat bahwa fermentasi meningkatkan total senyawa fenolik, dalam hal ini polifenol, di dalam minuman kombucha. Dan hasil pengujian total asam menunjukkan, semakin lama proses fermentasi, maka total asam akan semakin meningkat, dan jumlah asam tersebut berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan, kondisi yang sangat asam akan menyebabkan aktivitas antioksidan menurun. Diantara 4 sampel minuman kombucha, kombucha dari teh hijau menunjukkan total asam yang paling rendah. Hal ini sejalan dengan aktivitas antioksidan yang paling tinggi pada minuman kombucha teh hijau tersebut. Sehingga dapat disimpulkan bahwa proses fermentasi yang dilakukan oleh SCOBY dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari minuman teh, serta meningkat asam organik yang terkandung didalamnya.

**Kata Kunci :** fermentasi, kombucha, antioksidan, SCOBY

**Abstract.** Kombucha is kind of beverage fermented from tea by SCOBY (symbiotic Culture of Bacteria and Yeast). Many kind of leaves can used as substrate for making kombucha, such as tea leaves, coffee leaves, or else that contain high level of phenolic compound. The aim of this research are making four (4) kind of kombucha beverages and comparing these four (4) of antioxidant activity, total of acid and total of phenol. As the substrate, researcher using 4 kinds of tea, such as green tea (Sosro Heritage), black tea (Sosro Heritage), white tea (Twinings) and oolong tea (Ti Guan Yin). All 4 kinds of tea fermented in to kombucha beverages. Then, analyzed for its antioxidant activity, total of acid and total of phenol. antioxidant activity analyzed by using DPPH method showed that the lower  $IC_{50}$  value, the higher antioxidant activity. Also showed that there is an increase of antioxidant activity of the samples between before and after fermented by SCOBY. as in this research, kombucha green tea has the highest antioxidant activity among all the samples. Fermentation also effects in the total of phenol compound, as the the total amount of phenol increase by the fermentation. Testing of total organic acid showed that the organic acid increase during the fermentation period. and, the acidity of teh mixture can effect the antioxidant activity, the more acid of the mixture, the lower of antioxidant activity. As the conclusion, fermentation by SCOBY can increase the antioxidant activity, also the organic acid content of kombucha tea.

**Keywords :** fermentation, kombucha, antioxidant, SCOBY

## PENDAHULUAN

Teh mengandung berbagai senyawa kimia yang bermanfaat bagi tubuh ketika dikonsumsi. Kandungan senyawa kimia utama yang paling banyak dimanfaatkan adalah senyawa fenol yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Selain itu terdapat pula asam organik, beberapa mineral dan enzim. Proses pengolahan yang dilakukan pada daun teh akan berdampak pada kandungan senyawa kimia yang terdapat di dalamnya. Berdasarkan proses pengolahannya, minuman teh yang banyak dipasarkan terbagi atas 4 jenis, yaitu teh putih, teh hijau, teh oolong dan teh hitam. Teh putih dan teh hijau mengalami proses pengolahan yang jauh

lebih sedikit dibandingkan teh oolong dan teh hitam. Semakin banyak proses olahan yang dilalui saat pembuatan teh, semakin rendah total fenol yang terkandung (Rohdiana, (2015), Towaha (2013)).

Teh kombucha memiliki nama yang berbeda di tiap daerah. Di Cina, teh kombucha dikenal dengan nama teh manchuria (*Manchurian tea mushroom*). Nama ini muncul berkaitan dengan dinasti yang berkuasa saat itu, yaitu dinasti Manchuria. Minuman tersebut sudah dikonsumsi oleh anggota dinasti tersebut sejak dekade 1900-an. Di negara lain, teh ini memiliki nama yang beragam, seperti *cajnyc kvas*, *heldenpilz*, *mandarin tea mushroom*, *fungus japonicum*, *tea kwass*,

olinka, mogu, kargasok tea, zauberpilze, olga spring, jamur super, dan sebagainya (Naland, 2008). Di Indonesia sendiri, teh ini dikenal dengan jamur dipo yang berarti jamur benteng.

Kombucha merupakan minuman hasil fermentasi cairan teh dan gula. Fermentasi kombucha berlangsung dengan bantuan aktivitas bakteri dan khamir. Kombucha memiliki khasiat yang sangat berguna bagi tubuh manusia. Beberapa manfaat dari kombucha antara lain sebagai antioksidan, antibakteri, memperbaiki mikroflora usus, meningkatkan ketahanan tubuh dan menurunkan tekanan darah (Suhardini, dkk., 2016). Khasiat tersebut dikarenakan adanya kandungan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan. Semakin tinggi senyawa fenolik yang terkandung, maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya. Proses fermentasi oleh bakteri dan khamir akan meningkatkan jumlah fenol di dalam teh sehingga meningkatkan aktivitas antioksidannya.

Fermentasi yang terjadi pada pembuatan teh kombucha merupakan aktivitas dari mikroorganisme yang terdapat dalam starter kultur kombucha. SCOBY (*Symbiotic culture of bacteria and yeasts*) merupakan kultur campuran yang berisi bakteri dan khamir (yeast) (Wistiana dan Zubaidah, 2015). Kultur campuran tersebut terbagi menjadi dua bagian / bentuk yaitu bentuk cairan dan biofilm yang melayang di dalamnya (Chakravorty, dkk., 2016). Cairan yang terbentuk setelah fermentasi dapat dikonsumsi dan dapat pula dijadikan sebagai starter untuk fermentasi selanjutnya.

Mikroorganisme yang berperan dalam proses pembuatan teh kombucha yaitu: dari golongan bakteri adalah *Acetobacter xylinum*, sedangkan dari golongan khamir adalah beberapa spesies anggota genus *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces* dan *Saccharomyces* (Suhardini, dkk., 2016). Bakteri dan khamir saling berkompetisi untuk membentuk asam dan alkohol dari perombakan gula pada cairan teh.

Menurut Jaya, dkk. (2012), aktivitas antioksidan dapat diukur dengan menggunakan metode radikal DPPH. Metode banyak digunakan karena dianggap sederhana, mudah dikerjakan dan tidak memakan waktu banyak. Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuan senyawa dalam teh dalam menangkap radikal bebas berupa DPPH. Antioksidan akan menyumbangkan elektronnya kepada DPPH sehingga senyawa DPPH menjadi netral. Dengan demikian, DPPH akan mengalami perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna akan sejalan dengan jumlah elektron yang berpasangan dengan DPPH sehingga aktivitas antioksidan dapat diukur secara spektrofotometri.

## METODE PENELITIAN

Kombucha dibuat dengan menggunakan 4 varian teh yang berbeda, yaitu teh hijau (Sosro Heritage), teh hitam (Sosro Heritage), teh putih (Twinings), dan teh oolong (Ti Guan Yin). Pemanis yang digunakan adalah gula Gulaku kuning, dan starter kombucha diperoleh dari Wiki Kombucha Bali. Pembuatan teh kombucha : direbus air mineral sebanyak 3 liter, kemudian setelah api dimatikan, ditambahkan 5 kantong teh celup (10gram), dan 210 gram gula. Kemudian dimasukkan ke dalam toples pertumbuhan. Setelah dingin, ditambahkan starter kombucha 10% dan 1 keping SCOBY. Kemudian dilakukan fermentasi selama 14 hari. Setelah itu, dianalisis aktivitas antioksidan, total asan dan total fenol. Prosedur uji antioksidan (IC<sub>50</sub>) menggunakan metode DPPH (Dubois dkk., 1956 termodifikasi)

1. Pembuatan Larutan Induk 500 ppm : Sampel ditimbang sebanyak 0,005 g, kemudian dilarutkan dalam 10 mL metanol sehingga diperoleh sampel 500 ppm.
2. Pengujian Antioksidan (IC<sub>50</sub>) : Sampel 500 ppm dipipet sebanyak 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; dan 1,6 mL ke dalam tabung reaksi berbeda untuk variasi konsentrasi berturut-turut 10, 20, 40, 80, dan 160 ppm, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH 0,4 mM, kemudian dicukupkan volume larutan 5 mL dengan metanol, kemudian dihomogenkan, didiamkan pada tempat gelap selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum (515 nm).

Sedangkan Prosedur Total Polifenol/Tanin (Chanwitheesuk dkk., 2004) adalah sebagai berikut:

1. Preparasi Sampel : Sampel ditimbang sebanyak 0,05 g, kemudian ditambahkan 10 mL akuades panas (80 °C). Setelah itu didiamkan selama 10 menit, kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat sampel. Sampel diencerkan jika perlu.
2. Pengujian Total Polifenol/Tanin : Sampel sebanyak 5 mL ditambahkan 0,25 mL pereaksi Follin 50%, kemudian ditambahkan 0,5 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> jenuh, lalu didiamkan selama 30 menit. Setelah itu campuran diukur pada panjang gelombang maksimum (680 nm) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Tanin digunakan sebagai standar dan akuades digunakan sebagai blanko.

Terakhir, prosedur bilangan asam dan asam lemak bebas %FFA (Mehlenbacher, 1960) adalah sampel ditimbang sebanyak 1 g, kemudian ditambahkan 25 mL metanol netral panas, lalu ditambahkan 1 mL indikator PP. Setelah itu dititrasi dengan NaOH 0,1 N (hasil standarisasi) hingga terjadi titik akhir titrasi (perubahan warna dari tidak berwarna menjadi merah muda).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakter Fisik Kombucha

Kombucha dibuat dengan menggunakan substrat 4 varian teh yang berbeda, yaitu teh hijau, teh hitam, teh putih, teh oolong. Keempat jenis teh dasar tersebut dibandingkan sebelum dan setelah fermentasi. Hasil akhir setelah dilakukan fermentasi, secara umum mengalami perubahan yang cenderung sama, yakni mengalami perubahan warna menjadi lebih terang. Semakin lama waktu fermentasi, semakin jauh tingkat perubahan warna pada minuman kombucha. Menurut Nainggolan (2009), hal tersebut terjadi karena adanya aktivitas dari konsorsium mikroba, dalam hal ini SCOBY, yang mendegradasi warna. Pendegradasian warna terjadi karena mikroba yang memanfaatkan *total soluble solid* sebagai energi sehingga lama kelamaan pelarut dalam media akan habis dan cairan menjadi bening atau tidak berwarna. Lama waktu fermentasi juga mempengaruhi warna pada SCOBY, yang digunakan untuk proses fermentasi kombucha teh hijau, teh hitam, teh putih, dan oolong berwarna putih kekuningan, kemudian setelah proses fermentasi selesai warna SCOBY berubah menjadi cokelat pekat. Hal ini terjadi karena pada teh hijau, teh hitam, teh putih, dan teh oolong mengandung tanin atau zat tamak yang mampu terikat dengan lapisan selulosa SCOBY kombucha. Semakin lama waktu fermentasi dan semakin lama SCOBY terendam di dalam larutan kombucha teh hijau dan teh hitam maka akan berdampak pada warna SCOBY.

Jenis teh yang berbeda akan memberi warna berbeda pada Kombucha. Jika teh yang digunakan memiliki warna yang lebih gelap, selama proses fermentasi SCOBY juga akan terlihat lebih gelap. Perubahan warna SCOBY menjadi gelap juga disebabkan oleh yeast yang menempel pada area SCOBY dan terlihat seperti benang-benang yang menggantung dan membentuk bercak berwarna cokelat atau kuning sehingga tampilan lebih gelap. Kemudian, gula yang digunakan dalam proses pembuatan kombucha teh hijau dan teh hitam juga memengaruhi perubahan warna pada SCOBY. Jika gula yang digunakan berwarna kuning maka SCOBY juga akan mengikuti warna larutan yang dihasilkan oleh kombucha (Crum dan Alex, 2016).

Selain pembentukan etanol dan asam organik, dalam fermentasi minuman kombucha juga dihasilkan lapisan selulosa hasil bentukan dari SCOBY. Lapisan atau lempengan baru tersebut disebut sebagai baby SCOBY yang kemudian dapat digunakan sebagai starter fermentasi minuman kombucha. Semakin lama masa fermentasi, lempengan selulosa tersebut akan semakin tebal.

### Uji Aktivitas Antioksidan

Pengamatan peningkatan aktivitas antioksidan pada sampel teh hijau teramati peningkatan yang sangat signifikan antara sebelum dan setelah fermentasi, sama halnya yang terjadi pada teh putih. Sementara pada sampel teh hitam dan teh oolong peningkatan aktivitas antioksidan tidak terlihat begitu signifikan. Menurut Filbert dkk.(2014), semakin rendah nilai  $IC_{50}$  maka semakin baik aktivitas antioksidan. Jika dibandingkan diantara minuman kombucha yang dihasilkan, nilai  $IC_{50}$  kombucha teh hijau adalah antara 19,76 – 22,74  $\mu\text{g/mL}$ , kombucha teh putih nilai  $IC_{50}$  21,96 – 23,71  $\mu\text{g/mL}$ , kombucha teh hitam 61,39 – 62,17  $\mu\text{g/mL}$ , dan kombucha teh oolong 48,68 – 51,07  $\mu\text{g/mL}$ . Dari sini terlihat bahwa nilai  $IC_{50}$  terendah didapatkan pada kombucha teh hijau, sedangkan nilai  $IC_{50}$  tertinggi didapatkan pada kombucha teh hitam. Sehingga dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tertinggi dimiliki oleh kombucha teh hijau. Dan aktivitas antioksidan terendah dimiliki oleh kombucha teh hitam.

Tinggi rendahnya aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh kombucha dipengaruhi oleh aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh bahan dasar pembuatan kombucha, dalam hal ini teh yang digunakan. Hasil penelitian terlihat bahwa sejak awal aktivitas antioksidan teh hijau memang yang paling baik dibuktikan dengan nilai  $IC_{50}$  yang rendah. Menurut Suhardini dan Zubaidah (2016), aktivitas antioksidan meningkat sebagai hasil biotransformasi yang dilakukan oleh mikroorganisme yang terdapat di dalam sistem fermentasi yang melakukan biotransformasi senyawa dengan memanfaatkan enzim yang terdapat di dalam sel tanaman. Selain itu, hal ini juga didukung oleh adanya senyawa fenol yang terkandung di dalam bahan dasar, dalam hal ini teh, yang dapat meningkat seiring berjalannya waktu fermentasi

Hasil analisis sampel menunjukkan bahwa proses fermentasi meningkatkan jumlah polifenol dalam hal ini tanin yang dikandung. Hal ini sejalan dengan aktivitas antioksidan yang diukur pada bagian sebelumnya. Peningkatan total fenol ini diduga dipengaruhi oleh total fenol yang dimiliki oleh teh yang digunakan sebagai bahan dasar kombucha (Wistiana dan Zubaidah, 2015). Oleh sebab itu, peningkatan fenol yang terjadi berbeda-beda untuk setiap minuman kombucha yang dianalisis. Hassmy dkk. (2017) mengatakan bahwa meningkatnya aktivitas antioksidan sejalan dengan peningkatan senyawa fenolik bebas, sehingga semakin tinggi kadar fenolik yang dihasilkan

maka akan semakin tinggi pula aktivitas antioksidan dari minuman kombucha.

Menurut Essawet, et al (2015), sebagai hasil akhir dari fermentasi, di dalam minuman kombucha akan ditemukan senyawa lain selain senyawa utama, yaitu gula, etil glukonat, oxalat, sakarat, laktat, 5-asam ketoglukonat, 2,5-asam ketoglukonat, vitamin yang larut dalam air (B1, B6, B12, C), komponen teh seperti katekin, teaflavin, flavonol, dan lain-lain serta enzim hidrolitik.

Total Asam Aktivitas mikrobial di dalam sistem fermentasi dapat menyebabkan perubahan struktur dan komposisi di dalam minuman teh. Teh yang akan difermentasi diberi tambahan pemanis (gula, biasanya dalam bentuk sukrosa) sebagai sumber energi bagi konsorsium mikrobial tersebut (SCOBY). Sukrosa yang terdapat di dalam sistem fermentasi dihidrolisis oleh enzim invertase yang dimiliki oleh khamir dalam SCOBY menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa yang dihasilkan dirubah menjadi asam glukonat, sedangkan fruktosa dirubah menjadi berbagai asam organik (Jayabalan, et al., 2014). Essawet, et al. (2015) menjelaskan bahwa glukosa dan fruktosa difermentasi menjadi etanol oleh khamir, yang kemudian dioksidasi oleh bakteri asam asetat menjadi asam asetat. Komponen utama yang dihasilkan dalam proses fermentasi minuman teh kombucha adalah etanol, asam asetat dan asam glukonat.

Menurut Jayabalan, et al. (2008) dalam Fu, et al (2014), konsentrasi asam asetat akan mencapai nilai maksimum setelah 15 hari fermentasi pada teh hijau. Sementara itu, asam glukoronat mencapai nilai maksimum setelah 12 hari fermentasi pada teh hitam. Disini terlihat bahwa lama waktu fermentasi dapat menyebabkan perbedaan kandungan senyawa kimia, baik dari segi jumlah maupun konsentrasi. Umumnya, minuman teh kombucha dibuat dengan menggunakan lama waktu fermentasi 14 hari (waktu maksimum). Akan tetapi, bagi konsumen yang lebih menyukai rasa asam dapat menambah waktu fermentasi. Sementara itu, konsumen yang menyukai rasa yang lebih manis dapat melakukan panen minuman teh kombucha pada hari ke 8-10.

Pengujian total asam dilakukan pada sampel teh sebelum fermentasi dan setelah fermentasi (telah menjadi minuman kombucha) dengan masa fermentasi maksimum (14 hari). Analisis sampel menunjukkan grafik yang berbeda antara sebelum dan setelah fermentasi dari setiap sampel. Untuk ketiga sampel, teh putih, teh hitam dan teh oolong, mengalami peningkatan persentase total asam. Sementara itu pada teh hijau mengalami penurunan total asam setelah terjadi fermentasi. Dari hal ini dapat diambil asumsi bahwa pada teh hijau, proses fermentasi masih dapat dilanjutkan karena jumlah asam masih cukup rendah. Hal ini pula sejalan dengan hasil pengujian aktivitas

antioksidan yang memperlihatkan bahwa minuman teh kombucha yang dibuat dengan teh hijau memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi. Dalam penelitian ini diberikan perlakuan pemberian gula yang sama. Sukrosa yang terdapat di dalam gula akan dirombak menjadi glukosa dan fruktosa oleh mikroorganisme yang terdapat di dalam sistem fermentasi.

Menurut Wistiana dan Zubaidah (2015), total asam akan meningkat seiring dengan lamanya waktu fermentasi. Sejalan dengan penelitian tersebut, Jayabalan, et al., (2007) juga menemukan hasil bahwa asam organik di dalam sistem fermentasi kombucha akan meningkat seiring dengan bertambahnya lama waktu fermentasi. Pada sampel teh hijau, jumlah asam organik mencapai angka maksimum pada hari ke 15 fermentasi. Hal ini dikarenakan selama proses fermentasi, khamir dan bakteri melakukan metabolisme terhadap sukrosa dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam asetat, asam glukonat, dan asam glukoronat oleh karena itu terjadi peningkatan kadar asam-asam organik. Sehingga semakin tinggi asam organik yang terdapat dalam kombucha maka semakin tinggi pula total asamnya. Hal ini disebabkan oleh semakin lamanya waktu fermentasi, maka akan semakin banyak asam asetat yang terbentuk sebagai hasil metabolisme *Acetobacter Xylinum*. Semakin lama fermentasi, maka hasil fermentasi akan semakin asam.

Peningkatan asam organik di dalam minuman kombucha juga dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan. Menurut Hassmy dkk. (2017), selama proses fermentasi terjadi juga peningkatan jumlah asam-asam organik karena aktivitas khamir dan bakteri yang berada dalam kombucha. Suasana asam menyebabkan senyawa fenolik menjadi semakin stabil dan sulit melepaskan proton yang dapat berikatan dengan DPPH sehingga aktivitas antioksidannya menurun.

## KESIMPULAN

Minuman teh kombucha merupakan minuman hasil fermentasi dengan substrat teh. Fermentasi tersebut dilakukan oleh SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast) yang merupakan konsorsia mikrobial yang berisi gabungan bakteri dan khamir. Karena adanya aktivitas dari SCOBY menyebabkan peningkatan aktivitas antioksidan di dalam minuman kombucha setelah fermentasi. Selain itu, terjadi pula peningkatan total fenol dan total asam didalam minuman kombucha tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

Chakravorty, S. dkk., 2016. Kombucha tea fermentation : microbial and biochemical

- dynamics. *International journal of food microbiology*. Vol. 220 : 63-72
- Crum, Hannah dan Alex LaGory. 2016. *The Big Book of Kombucha: Brewing, Flavoring, and Enjoying the Health Benefits of Fermented Tea*. USA: Storey Publishing.
- Essawet, N.A., et al., 2015. Polyphenols and Antioxidant Activities of Kombucha Beverage Enriched with Coffe berry Extract. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* Vol. 1(3) : 399-409.
- Filbert, dkk. 2014. Penentuan Aktivitas Antioksidan Berdasarkan Nilai IC<sub>50</sub> Ekstrak Metanol dan Fraksi Hasil Partisinya pada Kulit Biji Pinang Yaki (*Areca vestiara* Giseke). *Jurnal MIPA Unsrat Online* 3 (2) : 149-154
- Fu, C., F. Yan, Z. Cao, F. Xie dan J. lin, 2014. Antioxidant Activities of Kombucha Prepared from Three Different Substrates and Changes in Content of Probiotics During Storage. *Food Science and Technology*. Vol. 3 (1) : 123-126.
- Hassmy, N.P., J. Abidjulu, dan A. Yudistira. 2017. Analisis Aktivitas Antioksidan Pada Teh Hijau Kombucha Berdasarkan Waktu Fermentasi Yang Optimal. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. Vol. 6, No. 4.
- Jaya, I. G. N. I. P., Leliqia, N. P. E, dan Wijaya, I. N. K., 2012. Uji aktivitas penangkapan radikal DPPH ekstrak produk teh hitam (*Camellia sinensis* (L.) O. K.) dan gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) sertaprofil KLT-densiometernya. *Jurnal farmasi udayana*. Vol. 1. No. 1: 86-101.
- Jayabalan, R., S. Marimuthu dan K. Swaminathan, 2007. Changes in Content of Organic Acids and Tea Polyphenols During Kombucha Tea Fermentation. *Food Chemistry*. Vol. 107: 392-398.
- Nainggolan, J. 2009. Kajian Pertumbuhan Bakteri *Acetobacter* sp. dalam Kombucha Rosela Merah (*Hibiscus sabdariffa*) pada kadar gula dan Lama Fermentasi yang Berbeda. *Tesis*. Pascasarjana Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Rohdiana, D., 2015. Teh : Proses, karakteristik dan komponen fungsionalnya. *Foodreview Indonesia*. Vol. 10. No. 8.: 34-37.
- Suhardini, Prasis N., dan Elok Zubaidah. 2016. Studi Aktivitas Antioksidan Kombucha Dari Berbagai Jenis Daun Selama Fermentasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. 4, No. 1 : 221-229.
- Towaha, J., dan Balittri. 2013. Kandungan Senyawa Kimia Pada Daun Teh (*Camellia sinensis*). *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. Vol. 19, No. 3: 1
- Wistiana, D., Dan Zubaidah, E., 2015. Karakteristik Kimiawi Dan Mikrobiologis Kombucha Dari Berbagai Daun Tinggi Fenol Selama Fermentasi. *JurnalPangan dan Agroindustri*. Vol. 3, No. 4: 1446-1457

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ORGANOLEPTIK KOMBUCHA TEH  
HIJAU DENGAN VARIASI TAKARAN DAN LAMA FERMENTASI**



**Disusun sebagai salah satu syarat menyelesaikan Program Studi Strata I  
pada Jurusan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan**

**Oleh:**

**DIYAH HENDRAWATI**

**A420160003**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI  
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
2020**

**HALAMAN PERSETUJUAN**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ORGANOLEPTIK KOMBUCHA TEH  
HIJAU DENGAN VARIASI TAKARAN DAN LAMA FERMENTASI**

**PUBLIKASI ILMIAH**

Oleh:

**DIYAH HENDRAWATI**

**A420160003**

Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji oleh:

Surakarta, 19 Juni 2020



**(Dra. Titik Suryani, M. Sc.)**

**NIDN. 0511046402**






HALAMAN PENGESAHAN

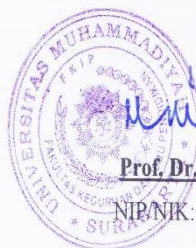
AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ORGANOLEPTIK KOMBUCHA TEH  
HIJAU DENGAN VARIASI TAKARAN DAN LAMA FERMENTASI

OLEH  
**DIYAH HENDRAWATI**  
A420160003

Telah dipertahankan di depan Dewan Penguji Fakultas Keguruan dan Ilmu  
Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Pada hari **Jum'at 19 Juni 2020** dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Dewan Penguji :**

1. Dra. Titik Suryani, M. Sc. (  )  
(Ketua Dewan Penguji)
2. Dra. Aminah Asngad, M. Si. (  )  
(Anggota I Dewan Penguji)
3. Triastuti Rahayu, M. Si. (  )  
(Anggota II Dewan Penguji)



Dekan,



**Prof. Dr. Harun Joko Pravitno**

NIP/NIK: 19650428 199303 1001

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam publikasi ilmiah ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali secara tertulis diacu dalam naskah dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kelak terbukti ada ketidakbenaran dalam pernyataan saya di atas, maka akan saya pertanggungjawabkan sepenuhnya.

Surakarta, 19 Juni 2020

Penulis



**DIYAH HENDRAWATI**

**A420160003**

## **AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ORGANOLEPTIK KOMBUCHA TEH HIJAU DENGAN VARIASI TAKARAN DAN LAMA FERMENTASI**

### **Abstrak**

Daun teh mengandung senyawa polifenol termasuk katekin, dan teaflavin yang berkhasiat sebagai antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan dan organoleptik kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimen. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial, dua faktorial. Faktor pertama yaitu variasi takaran teh hijau (T) terdiri atas 6 gram (T1), 8 gram (T2), dan 10 gram (T3). Faktor kedua yaitu lama fermentasi (F) yang terdiri atas 5 hari (F1), 7 hari (F2), dan 9 hari (F3). Hasil dari penelitian ini menunjukkan aktivitas antioksidan kombucha tertinggi pada perlakuan T<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 5 hari) sebesar 85,08%, sedangkan aktivitas antioksidan kombucha terendah pada perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) sebesar 72,32%. Kualitas organoleptik kombucha menunjukkan daya terima tertinggi pada perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) yang berwarna hijau keemasan, aroma khas asam kombucha dan rasa agak asam. Kesimpulan dari penelitian ini adalah variasi takaran teh hijau dan lama fermentasi berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan dan kualitas organoleptik kombucha teh hijau.

**Kata kunci :** Kombucha, Teh Hijau, Lama Fermentasi, Aktivitas Antioksidan, Organoleptik

### **Abstrack**

Tea leaves contain catechins, teaflavins and polyphenols as an antioxidant. The purpose of this study was to know antioxidant activity and organoleptic quality of green tea kombucha in variation of dose and the fermentation duration. The method used in this study was an experimental factorial pattern. The factorial was two factorial. The first factor was the variation of green tea amount (T) consisting of 6 grams (T1), 8 grams (T2), and 10 grams (T3). The second factor was fermentation duration (F) consisting of 5 days (F1), 7 days (F2), and 9 days (F3). The results of this study were the highest antioxidant activity of kombucha was T<sub>3</sub>F<sub>1</sub> treatment (10 grams of green tea with 5 days of fermentation) of 85,08% while the lowest antioxidant activity of kombucha was T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> treatment (6 grams of green tea with 9 days of fermentation) of 72,32%. The organoleptic quality of kombucha showed the highest acceptance of society was T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> treatment (6 gram green tea with 9 days fermentation time) had a golden green color and a slightly sour taste of kombucha. The conclusion of this study was the variation of green tea amount and fermentation duration affected the antioxidant activity and organoleptic quality of kombucha.

**Keywords:** Kombucha, Green Tea, Fermentation Duration, Antioxidant Activity, Organoleptic Quality

## 1. PENDAHULUAN

Minuman probiotik dapat dibuat dari berbagai macam bahan salah satunya adalah daun teh yang difermentasikan dengan bantuan mikrobia atau yang lebih dikenal dengan nama teh kombucha “Kombucha Tea”. Kombucha memiliki rasa yang asam namun menyegarkan. Jamur teh penghasil kombucha adalah campuran dari berbagai mikroba seperti *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida valida*, *Candida lambia* dan *Pichia fermentas*. (Ariani, 2015). Dalam proses pembuatan Kombucha Tea dapat menggunakan starter SCOBY (*Symbiosis Colony of Bactery Yeast*) yang di dalamnya terdapat bakteri, *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, dan *Acetobacter ketogenum*. *Yast*, *Schizosaeaharomyces pombe*, *Saccharomyces ludwigii* dan *Phichia fermentant*, *Saccharomyces apiculatus*, dan *Saccharomyces cerevisiae* (Winarti, 2006).

Kombucha masih asing di kalangan masyarakat Indonesia. Kombucha hidup pada medium teh manis yang sebenarnya sudah digunakan manusia sejak berabad-abad. Sampai sekarang kombucha masih dikonsumsi oleh banyak orang karena khasiatnya yang dikenal sangat banyak bagi tubuh. Kombucha memiliki banyak manfaat dalam bidang kesehatan sebagai antioksidan, antibakteri, memperbaiki mikroflora usus, dapat meningkatkan ketahanan tubuh dan menurunkan tekanan darah (Wistiana, 2015).

Pemanis yang umumnya digunakan dalam proses pembuatan teh kombucha adalah gula pasir namun karena gula pasir kurang baik apabila dikonsumsi secara berlebihan maka pemanis dapat diganti dengan menggunakan pemanis jenis lain misalnya saja gula aren. Pemanis berfungsi sebagai sumber energi bagi bakteri saat proses fermentasi berlangsung. Gula aren sendiri adalah gula yang dibuat dari nira pohon enau (aren), dimasak hingga kental sekali dan dicetak dalam bentuk-bentuk kepingan, bulat, atau silinder pendek. Gula aren mengandung kalori yang cukup tinggi dan efek sampingnya tidak begitu besar pada perubahan gula darah. Kandungan sukrosa pada gula aren yaitu 84,31% (Gardjito, 2013).

Jenis teh kombucha yang sering dikonsumsi oleh masyarakat salah satunya berasal dari jenis teh hijau. Teh hijau adalah family dari *theaceae* merupakan perdu atau tanaman pohon kecil berukuran paling tinggi 30 kaki. Daun teh mengandung senyawa polifenol termasuk katekin, teaflavin. Polifenol salah satunya berkhasiat sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan molekul yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi molekul lain sehingga mampu menangkal radikal bebas (Yuslianti, 2018). Kandungan kimia dalam daun teh kering antara lain katekin sebesar 0,08% dari berat kering teh, EC sebesar 0,41% dari berat kering, EGC sebesar 6,39% dari berat kering, ECG sebesar 0,65% dari berat kering, EGCG sebesar 3,28% dari berat kering, sehingga totalnya adalah 10,81% dari berat kering daun teh (Yuwono, 2017).

Penelitian Purnami (2018), menyatakan bahwa pengolahan teh menjadi teh kombucha sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, faktor tersebut diantaranya jenis teh yang digunakan dan lama proses fermentasi yang dilakukan dalam pembuatan kombucha. Penelitian Hassmy (2017), menyatakan bahwa pada kadar teh hijau 8 gram mengalami aktivitas antioksidan yang optimal dihari ke 1 sampai hari ke 5 proses fermentasi dengan nilai rata-rata penangkapan radikal DPPH sebesar 90,835-91,853.

Antioksidan merupakan senyawa yang sangat menonjol yang dapat di jumpai dalam teh yang sifatnya alami. Antioksidan yang terkandung di dalam teh hijau berupa senyawa flavonoid disebut dengan katekin. Tingginya kandungan katekin pada teh hijau berperan sebagai antioksidan alami. Aktivitas katekin ini berfungsi untuk mencegah radikal bebas sehingga dapat mengurangi kerusakan sel tubuh. Daya antioksidan komponen katekin lebih besar jika dibandingkan dengan vitamin C ataupun  $\beta$ -karoten (Syah, 2006).

Penelitian Widyasari (2016), menyatakan bahwa aktivitas antioksidan teh kombucha semakin meningkat seiring meningkatnya konsentrasi daun kelor yang digunakan. Sedangkan menurut penelitian Puspitasari (2017), menyatakan bahwa aktivitas antioksidan mengalami titik optimum pada fermentasi hari ke-7 sebesar 93,79% dan akan menurun dengan bertambahnya lama fermentasi. Hasil yang

didapatkan pada uji organoleptik menggunakan 15 panelis meliputi warna, rasa, aroma dan tingkat kesukaan sebanyak 80% dapat menerima dan 20% biasa saja.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan organoleptik kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi

## **2. METODE**

Penelitian ini merupakan penelitian dengan metode eksperimental dan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor. Faktor pertama yaitu variasi kadar teh hijau (T) terdiri dari 6 gram (T1), 8 gram (T2), dan 10 gram (T3). Faktor kedua yaitu lama fermentasi (F) yang terdiri dari 5 hari (F1), 7 hari (F2), dan 9 hari (F3). Masing-masing perlakuan dengan 2 kali ulangan. Prosedur pelaksanaan penelitian diawali dengan tahap persiapan alat dan bahan, kemudian tahap pelaksanaan pembuatan larutan teh hijau, penambahan starter dan proses fermentasi kombucha. Selanjutnya dilaksanakan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi dan Ilmu Pangan Universitas Slamet Riyadi dan uji organoleptik serta daya terima masyarakat di Dusun Geneng, RT 002/RW 002, Tunggulrejo, Jumantono, Karanganyar dengan melibatkan 20 panelis. Untuk mengetahui hasil penelitian teh kombucha dari bahan dasar teh hijau maka analisis data yang digunakan peneliti adalah deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Deskriptif kualitatif digunakan untuk menguji mutu organoleptik, sedangkan deskriptif kuantitatif digunakan untuk pengujian aktivitas antioksidan.

## **3. HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil penelitian aktivitas antioksidan kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi dapat dilihat pada Tabel 1, sedangkan hasil uji organoleptik (warna, aroma, rasa, daya terima) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Kombucha Teh Hijau Dengan Variasi Takaran Dan Lama Fermentasi

Perlakuan	Aktivitas Antioksidan (%)	Keterangan Perlakuan
T <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	82,45	Teh hijau 6 gram lama fermentasi 5 hari
T <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	84,79	Teh hijau 8 gram lama fermentasi 5 hari
T <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	85,08**	Teh hijau 10 gram lama fermentasi 5 hari
T <sub>1</sub> F <sub>2</sub>	76,02	Teh hijau 6 gram lama fermentasi 7 hari
T <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	76,46	Teh hijau 8 gram lama fermentasi 7 hari
T <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	80,9	Teh hijau 10 gram lama fermentasi 7 hari
T <sub>1</sub> F <sub>3</sub>	72,32*	Teh hijau 6 gram lama fermentasi 9 hari
T <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	72,76	Teh hijau 8 gram lama fermentasi 9 hari
T <sub>3</sub> F <sub>3</sub>	76,48	Teh hijau 10 gram lama fermentasi 9 hari

Keterangan :

\*Aktivitas Antioksidan Terendah

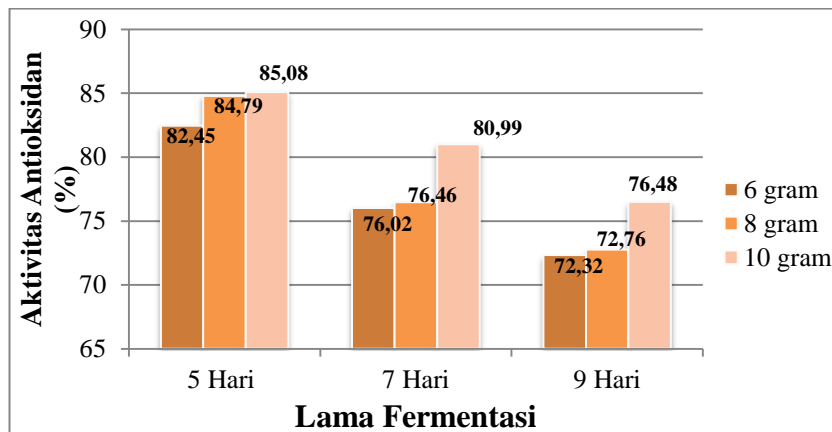
\*\*Aktivitas Antioksidan Tertinggi

Tabel 2 Hasil Uji Organoleptik Warna, Aroma, Rasa, & Daya Terima Kombucha Teh Hijau Dengan Variasi Takaran Dan Lama Fermentasi

Perlakuan	pH	Penilaian			
		Warna	Aroma	Rasa	Daya Terima
T <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	5	Hijau keemasan	Agak beraroma asam kombucha	Agak asam	Kurang suka
T <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	5	Hijau keemasan	Agak beraroma asam kombucha	Agak asam	Kurang suka
T <sub>3</sub> F <sub>1</sub>	5	Hijau kecoklatan	Agak beraroma asam kombucha	Asam	Kurang suka
T <sub>1</sub> F <sub>2</sub>	4	Hijau keemasan	Agak beraroma asam kombucha	Agak asam	Kurang suka
T <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	4	Hijau keemasan	Agak beraroma asam kombucha	Asam	Kurang suka
T <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	4	Hijau kecoklatan	Agak beraroma asam kombucha	Asam	Kurang suka

T <sub>1</sub> F <sub>3</sub>	4	Hijau keemasan	Beraroma asam kombucha	Agak asam	Kurang suka
T <sub>2</sub> F <sub>3</sub>	4	Hijau keemasan	Agak beraroma asam kombucha	Asam	Kurang suka
T <sub>3</sub> F <sub>3</sub>	4	Hijau kecoklatan	Agak beraroma asam kombucha	Asam	Kurang suka

### 3.1 Aktivitas Antioksidan



**Gambar 1** Histogram Uji Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan tabel 1 perlakuan yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi adalah T<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 5 hari) sebesar 85,08%, sedangkan perlakuan yang memiliki aktivitas antioksidan terendah adalah perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) sebesar 72,32%. Aktivitas antioksidan pada kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi cenderung mengalami penurunan seiring dengan bertambah lamanya proses fermentasi yang dilakukan. Peningkatan aktivitas antioksidan pada kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi diaktifkan oleh hasil metabolisme mikroorganisme pada kombucha selama proses fermentasi. Metabolisme mikroorganisme pada kombucha meningkatkan senyawa fenol karena adanya proses biotransformasi yang memanfaatkan enzim suatu sel tanaman untuk meningkatkan aktivitas biologis tertentu.

Penurunan aktivitas antioksidan seiring dengan bertambah lamanya proses fermentasi disebabkan karena selama proses fermentasi terjadi peningkatan jumlah asam-asam organik karena aktivitas khamir dan bakteri yang berada dalam kombucha. Suasana asam menyebabkan senyawa fenolik semakin stabil dan sulit

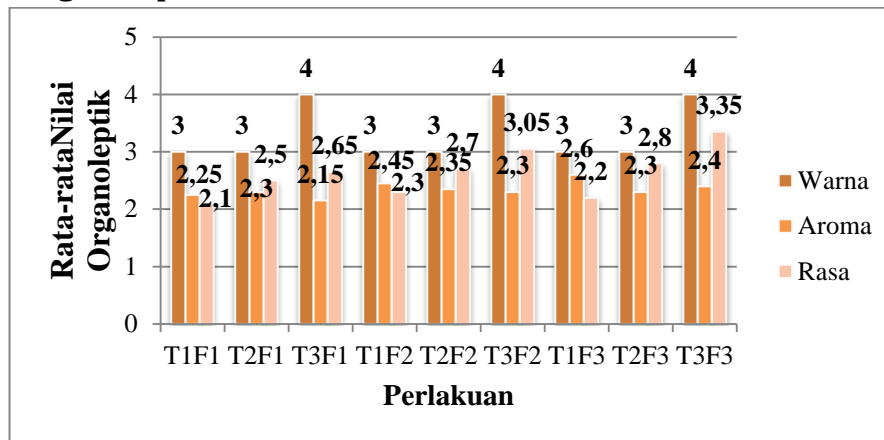


melepaskan proton yang dapat berikatan dengan DPPH sehingga aktivitas antioksidannya menurun. Hal ini sejalan dengan penelitian Hassmy (2017) bahwa aktivitas antioksidan pada kombucha teh hijau akan mengalami penurunan seiring dengan bertambah lamanya proses fermentasi dimana aktivitas antioksidan kombucha teh hijau mengalami aktivitas antioksidan yang optimum pada fermentasi hari ke-1 sampai hari ke-5 yaitu sebesar 90,835% dihari ke-1, 90,631% dihari ke-3 dan 91,853% dihari ke-5 dan mengalami penurunan pada hari ke-15 yaitu sebesar 91,445%. Di perkuat dengan penelitian Puspitasari (2017) bahwa aktivitas antioksidan pada kombucha teh hijau mengalami titik optimum pada fermentasi hari ke-7 sebesar 93,79% dan akan menurun dengan bertambahnya lama fermentasi.

Aktivitas antioksidan pada kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi mengalami peningkatan seiring dengan penggunaan takaran teh hijau yang semakin tinggi. Hal ini dikarenakan teh hijau mengandung senyawa kimia antara lain golongan fenol yang terdiri dari tannin, katekin, dan flavanol. Flavonoid mampu berperan sebagai antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas di dalam tubuh, sehingga mampu menghambat pemicu terjadinya tumor dan kanker. Katekin berperan untuk menurunkan kolesterol darah dan menghambat prevalensi kanker (Yuwono, 2017). Dengan kata lain semakin tinggi takaran teh hijau yang digunakan maka senyawa flavonoid dan katekin pada kombucha teh hijau akan bertambah yang menyebabkan aktivitas antioksidan bertambah seiring dengan semakin tingginya penggunaan takaran teh hijau.

Dapat disimpulkan bahwa lama fermentasi dan takaran teh hijau mempengaruhi aktivitas antioksidan pada kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi. Semakin lama fermentasi aktivitas antioksidan kombucha dengan variasi takaran teh hijau dan lama fermentasi semakin menurun, sedangkan semakin tinggi takaran teh hijau yang digunakan semakin meningkat aktivitas antioksidan yang dihasilkan.

### 3.2 Uji Organoleptik



**Gambar 2** Histogram Uji Organoleptik Warna, Aroma, dan Rasa

Berdasarkan gambar 2 dari menunjukkan rata-rata nilai organoleptik warna pada perlakuan T<sub>3</sub>F<sub>1</sub>, T<sub>3</sub>F<sub>2</sub> , dan T<sub>3</sub>F<sub>3</sub> yaitu 4 yang berarti bahwa warna kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi adalah hijau kecoklatan sedangkan untuk perlakuan yang lainnya menghasilkan rata-rata nilai organoleptik 3 yang berarti bahwa warna dari kombucha teh hijau adalah hijau keemasan. Hal ini sejalan dengan penelitian Purnami (2018) bahwa warna khas dari kombucha teh hijau adalah hijau keemasan. Warna yang dihasilkan kombucha teh hijau semakin pekat seiring dengan penggunaan teh hijau yang semakin banyak.

Berdasarkan gambar 2 dapat dilihat bahwa semakin lama proses fermentasi aroma yang dihasilkan cenderung semakin meningkat. Perlakuan yang memiliki rata-rata nilai organoleptik tertinggi adalah T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) dengan rata-rata nilai organoleptik aroma adalah 2,6 yang menunjukkan bahwa perlakuan tersebut memiliki aroma asam khas kombucha, sedangkan untuk perlakuan lainnya memiliki aroma agak asam khas kombucha dimana perlakuan rata-rata nilai organoleptik aroma terendah adalah T<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 5 hari). Hal ini sejalan dengan penelitian Purnami (2018), bahwa aroma pada kombucha disebabkan karena adanya asam-asam organik dan aroma yang ditimbulkan dari daun teh itu sendiri. Aroma pada kombucha teh hijau juga disebabkan oleh senyawa-senyawa volatil antara lain alkohol, asam asetat, dan asam-asam organik yang terbentuk sehingga menimbulkan aroma khas pada kombucha teh hijau. Di perkuat dengan penelitian Pratama (2015) bahwa aroma

asam pada kombucha disebabkan oleh adanya aktivitas bakteri dan khamir dalam metabolisme gula, hasil metabolisme berupa asam-asam organik seperti asam asetat, asam glukoronat dan asam glukonat serta alkohol yang memberikan aroma yang khas.

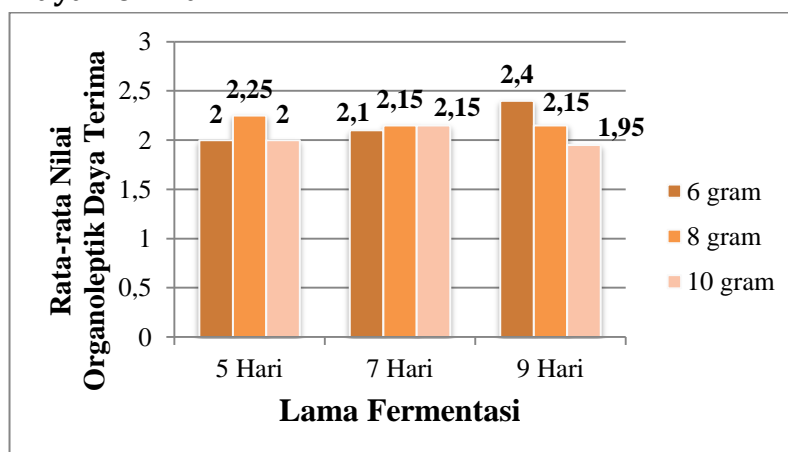
Berdasarkan gambar 2 perlakuan T<sub>3</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 9 hari) memiliki rata-rata nilai organoleptik rasa tertinggi yaitu 3,35 yang menunjukkan bahwa rasa dari kombucha perlakuan T<sub>3</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 9 hari) yaitu asam, sedangkan perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 5 hari) memiliki rata-rata nilai organoleptik terendah yaitu 2,1 yang menunjukkan bahwa rasa dari kombucha perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>1</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 5 hari) yaitu agak asam. Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi dilakukan maka semakin meningkat rasa asam yang dihasilkan. Hal ini sejalan dengan penelitian Puspitasari (2018) bahwa semakin lama waktu fermentasi menyebabkan pH teh kombucha semakin turun dan rasa asam semakin kuat. Rasa semakin meningkat disebabkan karena khamir dan bakteri melakukan metabolisme terhadap sukrosa dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik seperti asam asetat, asam glukoronat dan asam glukonat. Jika dilihat dari rata-rata pada perlakuan penambahan takaran teh hijau 6 gram yaitu antara 2,1 hingga 2,3, perlakuan 8 gram yaitu antara 2,5 hingga 2,8, dan perlakuan 10 gram yaitu antara 2,65 hingga 3,35, menunjukkan bahwa semakin tinggi takaran teh hijau yang digunakan semakin meningkat pula rasa asam yang dihasilkan oleh kombucha teh hijau. Dari hasil uji organoleptik rasa dapat disimpulkan bahwa variasi takaran teh hijau dan lama fermentasi mempengaruhi rasa yang dihasilkan oleh kombucha teh hijau.

Berdasarkan tabel 2 hasil uji derajat keasaman (pH) menunjukkan semakin lama waktu fermentasi pH yang dihasilkan semakin asam. Hal ini dikarenakan selama proses fermentasi khamir dan bakteri *Acetobacter Xylinum* yang terdapat di *starter* atau jamur kombucha melakukan metabolisme terhadap sukrosa atau gula yang terdapat dalam larutan seduhan teh hijau dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik, tingginya kadar gula dalam larutan teh menyebabkan peningkatan aktivitas mikroorganisme dan asam organik. Semakin tinggi asam organik yang

tedapat dalam kombucha maka total asam yang dihasilkan semakin tinggi sehingga menurunkan pH pada larutan teh.

Hal ini sejalan dengan penelitian Hassmy (2017), bahwa semakin lama waktu fermentasi dari hari ke-1 sampai hari ke-15 pH yang dihasilkan kombucha teh hijau semakin asam dikarenakan dikarenakan selama proses fermentasi khamir dan bakteri *Acetobacter Xylinum* yang terdapat di *starter* atau jamur kombucha melakukan metabolisme terhadap sukrosa atau gula yang terdapat dalam larutan seduhan teh hijau dan menghasilkan sejumlah asam-asam organik, tingginya kadar gula dalam larutan teh menyebabkan peningkatan aktivitas mikroorganisme dan asam organik. Semakin tinggi asam organik yang terdapat dalam kombucha maka total asam yang dihasilkan semakin tinggi sehingga menurunkan pH pada larutan teh. Hal ini juga sejalan dengan penelitian Nurikasari (2017), bahwa untuk pH dan reduksi gula pada fermentasi yang lebih lama akan mengalami penurunan. Di perkuat dengan penelitian Puspitasari (2017), bahwa selama proses fermentasi kombucha mengalami penurunan pH dikarenakan khamir akan mensintesis gula menjadi etanol dan oleh bakteri asam asetat dirombak menjadi asam-asam organik, seperti asam asetat dan asam glukonat dan beberapa konsentrasi asam-asam organik mengakibatkan penurunan pH. pH kombucha teh hijau berkisar antara 3-5.

### 3.3 Uji Daya Terima



Gambar 3 Histogram Uji Daya Terima

Berdasarkan gambar 3 hasil uji daya terima kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi cenderung sama untuk semua perlakuan dimana rata-rata nilai organoleptik daya terima berkisar antara 1,95 sampai 2,4. Berdasarkan rata-rata nilai organoleptik tersebut daya terima untuk 20 panelis pada kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi adalah kurang suka. Perlakuan yang menunjukkan rata-rata nilai organoleptik daya terima terendah yaitu perlakuan T<sub>3</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 9 hari) dimana pada perlakuan ini rasa yang dihasilkan kombucha dengan variasi takaran teh hijau dan lama fermentasi cenderung lebih asam dibandingkan dengan perlakuan lainnya dikarenakan proses fermentasi yang lebih lama serta penggunaan takaran teh hijau yang lebih banyak, sedangkan perlakuan yang menunjukkan rata-rata nilai organoleptik daya terima tertinggi yaitu perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) dimana pada perlakuan ini rasa yang dihasilkan kombucha dengan variasi takaran teh hijau dan lama fermentasi dengan rasa yang sedikit asam. Hal ini juga menunjukkan bahwa dari 20 panelis sebagian besar lebih menyukai rasa asam yang tidak terlalu pekat dari kombucha teh hijau dengan variasi takaran dan lama fermentasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Puspitasari (2018), bahwa hal ini disebabkan karena merupakan hal baru dalam merasakan teh kombucha, tetapi karena manfaatnya baik untuk kesehatan sehingga produk teh kombucha bisa diterima sebagai minuman fungsional untuk antioksidan oleh panelis.

#### **4. PENUTUP**

Aktivitas antioksidan tertinggi kombucha pada perlakuan T<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (teh hijau 10 gram dengan lama fermentasi 5 hari) sebesar 85,08%, sedangkan aktivitas antioksidan terendah kombucha pada perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) sebesar 72,32%. Kualitas organoleptik kombucha menunjukkan daya terima tertinggi pada perlakuan T<sub>1</sub>F<sub>3</sub> (teh hijau 6 gram dengan lama fermentasi 9 hari) yang memiliki warna hijau keemasan, aroma khas asam kombucha dan rasa agak asam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ariani. 2015. *Pengetahuan Bahan Makanan dan Minuman Seri: Babi dan Khamr*. Malang: Penerbit Gunung Samudera.
- Eric, & Childs, Jessica. 2013. *Kombucha (The Amazing Probiotic Tea That Cleanses, Heals, Energizes, and Detoxifies)*. New York: AVERY.
- Hassym, Nursyah Putri; Abidjulu, Jemmy; & Yudistira, Adithya. 2017. "Analisis Aktivitas Antioksidan pada Teh Hijau Kombucha Berdasarkan Waktu Fermentasi yang Optimal". *Jurnal Ilmiah Farmasi*, Vol. 6. No. 4. Hal: 67-74.
- Kumalaningsih, S. 2014. *Pohon Industri Potensial pada Sistem Agrobisnis*. Malang: UB Press.
- Nurikasari, Maulina; Puspitasari, Yenny, & Siwi, Retno Palupi Yoni. 2017. "Characterization and Analysis Kombucha Tea Antioxidant Activity Based On Long Fermentation As a Beverage Functional". *Journal of Global Research in Public Health*, Vol. 2. Num. 2. Page: 90-96.
- Pratama, N., Usman, P., dan Yusmarini. 2015. "Kajian Pembuatan Teh Kombucha Dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*)". *JOM FAPERTA* Vol. 2. No. 2.
- Purnami, Ita K.; Jambe, Anom; & Wisaniyasa, Ni Wayan. 2018. "Pengaruh Jenis Teh Terhadap Karakteristik Teh Kombucha". *Jurnal ITEPA*, Vol. 7. No. 2. Hal: 1-10.
- Puspitasari, Yenny. 2017. "Analisis Kandungan Vitamin C Teh Kombucha Berdasarkan Lama Fermentasi Sebagai Alternatif Minuman Untuk Antioksidan". *Global Health Science*, Vol.2. No.3. Hal: 245-253.
- Syah, Andi Nur Alam. 2006. *Taklukkan Penyakit dengan Teh Hijau*. Jakarta: AgroMedia Pustaka.
- Widyasari, Agustina. 2016. Aktivitas Antioksidan & Organoleptik Kombucha Daun Kelor dengan Lama Fermentasi dan Konsentrasi Daun Kelor yang Berbeda. *Publikasi Ilmiah Skripsi Pendidikan Biologi*, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Yuslianti, Euis R. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish.
- Yuwono, Sudarminto Setyo. 2017. *Teknologi Pangan Hasil Perkebunan*. Malang: UB Press.



Article

# Chemical Profile and Antioxidant Activity of the Kombucha Beverage Derived from White, Green, Black and Red Tea

Karolina Jakubczyk , Justyna Kałduńska , Joanna Kochman and Katarzyna Janda \*

Department of Human Nutrition and Metabolomics, Pomeranian Medical University in Szczecin, 24 Broniewskiego Street, 71-460 Szczecin, Poland; jakubczyk.kar@gmail.com (K.J.); justynakaldunska@wp.pl (J.K.); kochmaan@gmail.com (J.K.)

\* Correspondence: Katarzyna.Janda@pum.edu.pl; Tel.: +48-091-441-4818

Received: 27 April 2020; Accepted: 21 May 2020; Published: 22 May 2020



**Abstract:** Kombucha is a fermented tea beverage prepared as a result of the symbiotic nature of bacterial cultures and yeast, the so-called SCOBY (*Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeasts*). Kombucha is characterised by rich chemical content and healthy properties. It includes organic acids, minerals and vitamins originating mainly from tea, amino acids, and biologically active compounds—polyphenols in particular. Kombucha is prepared mainly in the form of black tea, but other tea types are increasingly often used as well, which can significantly impact its content and health benefits. This work shows that the type of tea has a significant influence on the parameters associated with the antioxidant potential, pH, as well as the content of acetic acid, alcohol or sugar. Red tea and green tea on the 1st and 14th day of fermentation are a particularly prominent source of antioxidants, especially polyphenols, including flavonoids. Therefore, the choice of other tea types than the traditionally used black tea and the subjection of these tea types to fermentation seems to be beneficial in terms of the healthy properties of kombucha.

**Keywords:** kombucha; tea; fermentation; antioxidant; flavonoids; polyphenols

## 1. Introduction

Unhealthy lifestyle, intense physical exercising, stress, and environmental pollution are factors that influence the excessive synthesis of reactive oxygen species. The disturbance in homeostasis caused by free radicals leads to the formation of oxidative stress and damage to the structures of the human organism [1–4]. Illnesses that can be caused by free radical disorders include atherosclerosis, neurodegenerative diseases, such as Parkinson’s or Alzheimer’s disease, or even obesity. In order to maintain the balance between the production and removal of reactive oxygen species, it is important to search for easily accessible sources of antioxidants [1]. The main and the most widespread antioxidants are vitamins E, A and C, as well as polyphenolic compounds [1–3]. Phenolic compounds are an essential part of the human diet and are of considerable interest due to their health-promoting properties, including antioxidant effects. They are capable of capturing peroxide anions, lipid radicals, hydroxyl radicals and reactive oxygen species. Plant-derived polyphenols have a beneficial impact on slowing down the ageing process and reducing the risk of age-related neurodegenerative conditions, such as Alzheimer’s disease, Parkinson’s disease or ischaemic brain injury [5,6]. Antioxidant sources are mainly searched for in natural plant resources. Antioxidants are present in many easily available sources, such as tea, coffee, fruits, vegetables, spices and herbs. They complement everyday diet, contributing to good health.

Kombucha is a fermented tea drink created with the use of symbiotic cultures of bacteria and yeast, the so-called SCOBY (*Symbiotic Cultures of Bacteria and Yeasts*). Kombucha is prepared by combining tea

with sugar (10%), sourdough from previous fermentation (10%) and SCOBY. SCOBY, when added to sugared tea, initiates fermentation, which results in the formation of various new bioactive compounds. The fermentation is conducted at room temperature for a period of 7–14 days. Various tea types can be used to produce kombucha, including green tea, as well as fermented, e.g., red, black or yellow tea. However, black tea and white sugar (saccharose) are considered the traditional and best ingredients that condition the proper content of the drink as well as its healthy properties. The taste of the drink is described as sour, slightly fruity and delicately sparkling, but after a few days of storage it becomes similar to the taste of wine vinegar [7].

Studies of kombucha proved its anti-bacterial, antioxidant, anti-diabetic properties, as well as its ability to reduce the concentration of cholesterol, to support the immune system and to stimulate the detoxification of the liver [8,9]. Kombucha drinks also feature minerals originating mainly from tea (potassium, manganese, fluoride ions), vitamins (E, K, B), amino acids (especially theanine, a derivative of glutamine), as well as other compounds that are formed as the result of numerous reactions occurring during the fermentation of the tea. During the oxidation of polyphenolic compounds, catechins, flavonoids and other compounds with health benefits for the organism are formed [8,10,11].

Various parameters influence the properties and content of kombucha, including the type of tea, fermentation time, the content of SCOBY colonies, and temperature. Despite the increase in the popularity of this drink's consumption, information regarding the influence of the many parameters or tea types on the properties and content is still not fully available. Hence, the aim of this research was to analyse the antioxidant properties and the content of the drink prepared from black, green, white and red teas at different time points of fermentation [10].

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant Material

The material consisted of four types of leaf tea (*Camellia sinensis*): black Ceylon originating in India, green Gunpowder, white tea and red tea (Pu-ERH) originating in China or India.

### 2.2. Preparation of Kombucha

The kombucha starter cultures, also known as SCOBY (which generally consists of *Acetobacter xylinum*, *Gluconobacter*, *S. cerevisiae*), were obtained from a commercial source from Poland. The starter culture used in the present article was stored in a refrigerator (4 °C) and consisted of sour broth and cellulosic layer (SCOBY floating on the liquid surface). One hundred grams of sugar (100.0 g/L, 10.0%), eight grams of tea (8.0 g/L, 0.8%) and 1 litre of hot, distilled water (90 °C) were mixed. The solution was infused for 10 min in a sterile conical flask. After cooling (30 °C), the tea decoction was filtered through nylon filters (0.45 µm, diam. 25 mm, Sigma-Aldrich, Poznań, Poland) into clean glass bottles.

### 2.3. Fermentation of Kombucha

Kombucha cultures were kept under aseptic conditions. Fermentation was carried out by incubating the kombucha culture at  $28 \pm 1$  °C for 1, 7 and 14 days. Replicates were prepared so that each replicate was completely collected after its stipulated period of fermentation. The kombucha obtained was filtered and analysed.

### 2.4. Antioxidant Activity by the DPPH Methods

The antioxidant activity of samples was measured with the spectrophotometric method using synthetic radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma, Poznań, Poland) according to Brand-Williams et al. and Pekkarinen et al. [12,13]. The spectral absorbance was immediately measured at 518 nm (Agilent 8453UV). All assays were performed in triplicate. The results are shown in % of DPPH radical inhibition.

Antioxidant potential (antioxidant activity, inhibition) of tested solutions has been expressed by the percent of DPPH inhibition, using the following formula:



$$\% \text{ inhibition} = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \times 100$$

where:

A<sub>0</sub>—absorbance of DPPH solution at 518 nm without tested sample

A<sub>s</sub>—absorbance of DPPH solution at 518 nm with tested sample

### 2.5. The Determination of the Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) Method

The FRAP method, used to determine the total reduction potential, which also means the antioxidant properties of tested ingredient, is based on the ability of the test sample to reduce Fe<sup>3+</sup> ions to Fe<sup>2+</sup> ions. The FRAP unit determines the ability to reduce 1 micromole Fe<sup>3+</sup> to Fe<sup>2+</sup> according to Benzie and Strain [14,15]. Absorbance at 593 nm was measured (8453UV, AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, CA, USA). All assays were performed in triplicate. The ferric ion reducing antioxidant power was determined from the calibration curve using Fe(II)/L as the reference standard (0–5000 µM Fe(II)/L).

### 2.6. The Determination of the Total Polyphenols Content (TPC)

Determination of polyphenols was performed according to ISO 14502-1; Singleton and Rossi method using the Folin-Ciocalteu reagent [16]. Absorbance at 765 nm was measured (8453UV, AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, USA). All assays were performed in triplicate. The content of polyphenols was determined from the calibration curve using gallic acid as the reference standard (0–200 mg/L of gallic acid).

### 2.7. The Determination of the Total Flavonoids Content (TFC)

Determination of total flavonoids content was performed according to the Pekal and Pырzysk and Hu methods [17,18]. Different concentrations of flavonoids were used in the plotting of the standard calibration curve. The content of flavonoids was determined from the calibration curve using rutin equivalent as the reference standard (0–120 mg/L of rutin equivalent). Absorbance at 510 nm was measured (8453UV, AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, CA, USA). All assays were performed in triplicate.

### 2.8. The Determination of pH

The pH of both the fermented beverage and the unfermented control was determined by a pH meter (SCHOTT Instruments; SI Analytics Mainz, Mainz, Germany).

### 2.9. The Determination of Acetic Acid

Samples of tea and kombucha at 1, 7 and 14 days of fermentation were filtered through nylon filters (0.45 µm, diam. 25 mm, Sigma-Aldrich, Poznań, Poland). Acetic acid (AA) was analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) using a 1200 series HPLC connected to a 1100 series RI detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with a Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The column was eluted with a degassed mobile phase containing 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 2.25 at 60 °C with a flow rate of 0.5 mL/min for 30 min per sample [19,20]. The results are shown in mg acetic acid/L.

### 2.10. The Determination of Alcohol

The alcohol content was measured using an alcoholometer (Browin, Łódź, Poland). The alcoholometer was immersed in the liquid and the result was read from the scale.

### 2.11. The Determination of Sugar Content

The total sugar content was measured with a laboratory refractometer RL3 (Polish Optical Works, Warsaw, Poland) from Brix scale.

### 2.12. Statistical Analysis

In all the experiments, three samples were analysed, and all the assays were carried out at least in triplicate. The statistical analysis was performed using Stat Soft Statistica 13.0 and Microsoft Excel 2017 (StatSoft Polska, Poland). The results are expressed as mean values and standard deviation (SD). To assess the differences between the examined parameters, the Tukey post hoc test was used. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ . To control type I errors, the false discovery rate (FDR) approach was used. The calculations were performed using the *p.adjust* function of the stats package in R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## 3. Results

### 3.1. The Analysis of the Antioxidant Properties of Kombucha

The analysis of the antioxidant potential of the studied samples revealed that the content of antioxidant compounds was in the range between 70.62% and 94.61% DPPH inhibition (Table 1). The time of fermentation and the type of tea had an influence on the anti-radical properties of kombucha. In terms of the type of tea, kombucha prepared from green tea was characterised by the highest antioxidant potential, achieving the highest value on the first day of fermentation. In the case of each of the analysed kombucha drinks, the ability to deactivate free radicals decreased with the increase in the time of fermentation.

The highest content of reductive compounds labelled by the FRAP method was observed in all tea types before the fermentation process (5374.1–4486.7  $\mu\text{M Fe(II)/L}$ ). The addition of sourdough caused a rapid decrease in the reductive properties of kombucha (3626.3–2274.0  $\mu\text{M Fe(II)/L}$ ), but after 7 days of fermentation, the potential increased (4801.1–2725.9  $\mu\text{M Fe(II)/L}$ ), then it became lower on the 14th day of fermentation (3172.9–1573.9  $\mu\text{M Fe(II)/L}$ ). When analysing the type of the selected tea, kombucha made from green tea was characterised by the highest reductive potential (Table 1).

The analysis of the total content of polyphenols in kombucha, as well as the tea types used for its preparation, revealed that the content of compounds belonging to this group fluctuated in the range from 183.12 mg/L in black tea before the addition of sourdough and SCOBY to 320.12 mg/L in kombucha prepared from green tea on the 14th day of fermentation. In the case of kombucha from green, red and white teas, the highest polyphenol content was observed on the 14th day of fermentation. In kombucha made from green and white tea, the concentration of polyphenolic compounds increased proportionally with the increase in the duration of fermentation. The content of flavonoids, a compound from the group of polyphenols, was the highest for all tea types before starting the fermentation process (395.93 mg/L in red tea). The addition of sourdough significantly reduced flavonoid content in the analysed samples. The decrease in flavonoid content was progressing, achieving the lowest values on the 7th day of fermentation. During the next labelling (14th day of fermentation), there was another increase in the content of this compound (Table 1). In the case of most of the studied parameters, statistically significant differences were observed between tea types as well as the time of fermentation (Table 1).

Table 2 presents the statistically significant correlations between polyphenol content, flavonoids, antioxidant potential (DPPH, FRAP) and the duration of fermentation. Statistical analysis of the results showed significant correlations between the parameters characterising the kombucha antioxidant potential. It was shown that the correlations between the tested parameters are very different, depending on the type of tea (Table 2).

**Table 1.** Antioxidant potential: DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) free radical method, ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)), the total polyphenols content (TPC) and total flavonoids content (TFC) in Kombucha tea.

Type of Beverage	Time Points (Day)	Total Flavonoids Content (TFC) [mg/L]	DPPH [%]	FRAP [ $\mu$ M Fe(II)/L]	Total Polyphenols Content (TPC) [mg/L]
<b>Green Tea Kombucha—GK</b>	tea	254.1 $\pm$ 8.6 <sup>*,2,3,4,5</sup>	80.33 $\pm$ 2.00 <sup>*,2,3,4</sup>	5374.1 $\pm$ 62.1 <sup>*,1,2,3,5,9,13</sup>	269.0 $\pm$ 0.9 <sup>*,3,4,5,9,13</sup>
	1	196.2 $\pm$ 2.6 <sup>*,1,3,4,10,14</sup>	94.61 $\pm$ 1.29 <sup>*,1,3,4,6,10,14</sup>	3626.3 $\pm$ 36.8 <sup>*,1,3,4,6,10,14</sup>	277.6 $\pm$ 0.4 <sup>*,3,4,6,10,14</sup>
	7	146.8 $\pm$ 3.4 <sup>*,1,2,4,7,11,15</sup>	91.40 $\pm$ 0.57 <sup>*,1,2,4,7,11,15</sup>	4801.1 $\pm$ 69.2 <sup>*,1,2,7,11,15</sup>	299.6 $\pm$ 3.1 <sup>*,1,2,4,7,11,15</sup>
	14	181.3 $\pm$ 4.8 <sup>*,1,2,3,8,12,16</sup>	88.23 $\pm$ 0.83 <sup>*,1,2,3,8,12,16</sup>	3172.9 $\pm$ 379.7 <sup>*,1,2,8,12,16</sup>	320.1 $\pm$ 3.5 <sup>*,1,2,3,8,12,16</sup>
<b>Black Tea Kombucha—BK</b>	tea	231.7 $\pm$ 11.0 <sup>*,1,6,7,8,9,13</sup>	70.40 $\pm$ 0.78 <sup>*,1,6,8,9,13</sup>	4486.7 $\pm$ 65.0 <sup>*,1,6,7,8,9,13</sup>	183.1 $\pm$ 2.3 <sup>*,6,7,8</sup>
	1	149.1 $\pm$ 0.6 <sup>*,2,5,7,8,10,14</sup>	78.62 $\pm$ 0.63 <sup>*,2,5,7,8,10,14</sup>	2274.0 $\pm$ 36.2 <sup>*,2,5,7,10,14</sup>	201.0 $\pm$ 5.7 <sup>*,5</sup>
	7	90.5 $\pm$ 0.7 <sup>*,5,6,8,11</sup>	70.63 $\pm$ 0.53 <sup>*,6,3,11,15</sup>	2725.9 $\pm$ 41.0 <sup>*,5,6,8,7,11,15</sup>	219.5 $\pm$ 2.1 <sup>*,5,3,7,15</sup>
	14	126.7 $\pm$ 5.2 <sup>*,5,6,7</sup>	61.04 $\pm$ 1.99 <sup>*,4,5,6,7,12,16</sup>	1573.9 $\pm$ 182.1 <sup>*,4,5,7,12,16</sup>	206.0 $\pm$ 1.2 <sup>*,5,4,6,12</sup>
<b>White Tea Kombucha—WK</b>	tea	209.3 $\pm$ 3.1 <sup>*,5,10,11,12</sup>	78.55 $\pm$ 0.35 <sup>*,10,12,1</sup>	4890.0 $\pm$ 8.90 <sup>*,1,5,10,11,12,13</sup>	184.6 $\pm$ 2.0 <sup>*,10,11,12</sup>
	1	132.6 $\pm$ 4.8 <sup>*,2,6,9,11,12,14</sup>	89.01 $\pm$ 0.99 <sup>*,9,11,12</sup>	2555.4 $\pm$ 26.2 <sup>*,2,6,9,11,12,14</sup>	200.8 $\pm$ 7.6 <sup>*,9,10,11</sup>
	7	83.8 $\pm$ 3.3 <sup>*,7,9,10,12</sup>	79.13 $\pm$ 0.93 <sup>*,9,10,12,3,7,15</sup>	3263.8 $\pm$ 46.3 <sup>*,3,7,9,10,12,15</sup>	205.6 $\pm$ 3.0 <sup>*,3,7,9,10,12,15</sup>
	14	111.6 $\pm$ 2.2 <sup>*,9,10,11</sup>	70.42 $\pm$ 1.38 <sup>*,9,10,11,16</sup>	2290.6 $\pm$ 171.0 <sup>*,4,8,9,10,11,16</sup>	228.1 $\pm$ 0.5 <sup>*,4,8,9,10,11,16</sup>
<b>Red Tea Kombucha—RK</b>	tea	395.9 $\pm$ 2.0 <sup>*,1,5,9,14,15,16</sup>	78.54 $\pm$ 0.06 <sup>*,5,14,16</sup>	5261.9 $\pm$ 26.5 <sup>*,1,5,9,14,15,16</sup>	229.5 $\pm$ 2.9 <sup>*,15,16,1,5,9</sup>
	1	292.5 $\pm$ 2.3 <sup>*,2,6,10,13,15,16</sup>	89.56 $\pm$ 0.08 <sup>*,13,15,16</sup>	2704.6 $\pm$ 7.3 <sup>*,2,6,10,13,15,16</sup>	219.8 $\pm$ 22.8 <sup>*,15,16</sup>
	7	198.1 $\pm$ 2.9 <sup>*,3,7,11,13,14,16</sup>	77.37 $\pm$ 0.80 <sup>*,3,7,11,14,16</sup>	4314.3 $\pm$ 53.5 <sup>*,3,7,11,13,14,16</sup>	270.5 $\pm$ 2.4 <sup>*,3,7,11,13,14</sup>
	14	242.5 $\pm$ 4.8 <sup>*,4,8,12,13,14,15</sup>	74.78 $\pm$ 2.11 <sup>*,12,13,14,15</sup>	2692.5 $\pm$ 202.8 <sup>*,4,8,12,13,14,15</sup>	271.9 $\pm$ 3.6 <sup>*,4,8,12,13,14</sup>

\* FDR  $p \leq 0.05$  between type of Kombucha (0, 1, 7, 14 days of fermentation),  $p \leq 0.05$  between particular subgroup: <sup>1</sup>—GK tea, <sup>2</sup>—GK 1, <sup>3</sup>—GK 7, <sup>4</sup>—GK 14, <sup>5</sup>—BK tea, <sup>6</sup>—BK 1, <sup>7</sup>—BK 7, <sup>8</sup>—BK 14, <sup>9</sup>—WK tea, <sup>10</sup>—WK 1, <sup>11</sup>—WK 7, <sup>12</sup>—WK 14, <sup>13</sup>—RK tea, <sup>14</sup>—RK 1, <sup>15</sup>—RK 7, <sup>16</sup>—RK.

**Table 2.** Statistically significant (at  $p \leq 0.05$ ) correlation ( $r$ ) between parameters for kombucha tea \*  $p$  value  $\leq 0.05$ .

Correlations ( $r$ ) between Analysed Parameters				
Kombucha	Green Tea	Black Tea	White Tea	Red Tea
<b>Time vs</b>	TPC ( $r = 0.92$ ) *	TPC ( $r = 0.37$ ) *	TPC ( $r = 0.89$ ) *	TPC ( $r = 0.69$ ) *
	FRAP ( $r = 0.73$ ) *	DPPH ( $r = -0.96$ ) *	FRAP ( $r = 0.86$ ) *	FRAP ( $r = 0.62$ ) *
	DPPH ( $r = -0.94$ ) *		DPPH ( $r = -0.98$ ) *	DPPH ( $r = -0.84$ ) *
<b>Flavonoids vs</b>	FRAP ( $r = -0.66$ ) *	TPC ( $r = -0.37$ ) *	TPC ( $r = -0.43$ ) *	TPC ( $r = -0.66$ ) *
		FRAP ( $r = -0.88$ ) *	FRAP ( $r = -0.55$ ) *	FRAP ( $r = -0.78$ ) *
				DPPH ( $r = 0.56$ ) *
<b>TPC vs</b>	Time ( $r = 0.92$ ) *	Time ( $r = 0.36$ ) *	Time ( $r = 0.89$ ) *	Time ( $r = 0.69$ ) *
	FRAP ( $r = 0.75$ ) *	Flavonoids ( $r = -0.36$ ) *	Flavonoids ( $r = -0.43$ ) *	Flavonoids ( $r = -0.66$ ) *
	DPPH ( $r = -0.85$ ) *		DPPH ( $r = -0.91$ ) *	FRAP ( $r = 0.87$ ) *
<b>FRAP vs</b>	Time ( $r = 0.73$ ) *		Time ( $r = 0.86$ ) *	Time ( $r = 0.62$ ) *
	Flavonoids ( $r = -0.65$ ) *	Flavonoids ( $r = -0.88$ ) *	Flavonoids ( $r = -0.55$ ) *	Flavonoids ( $r = -0.78$ ) *
	TPC ( $r = 0.75$ ) *		TPC ( $r = 0.93$ ) *	DPPH ( $r = -0.84$ ) *
<b>DPPH vs</b>	DPPH ( $r = -0.70$ ) *		DPPH ( $r = -0.87$ ) *	
	Time ( $r = -0.94$ ) *	Time ( $r = -0.96$ ) *	Time ( $r = -0.98$ ) *	Time ( $r = -0.84$ ) *
	TPC ( $r = -0.85$ ) *		TPC ( $r = -0.91$ ) *	Flavonoids ( $r = 0.56$ ) *
	FRAP ( $r = -0.70$ ) *		FRAP ( $r = -0.87$ ) *	TPC ( $r = -0.80$ ) *
				FRAP ( $r = -0.84$ ) *

### 3.2. The Analysis of pH, Content of Acetic Acid, Sugar and Alcohol in Kombucha

During the analysis of pH values, it was observed that the pH of all of the studied samples decreased with the increase in the duration of fermentation and the increase in the content of acetic acid. The rapid decrease in this parameter (1.8 unit in the case of kombucha prepared from black tea, up to 2.97 in the case of white kombucha) was caused by the addition of sourdough and SCOBY culture (1st day of fermentation). Further fermentation did not have a significant influence on the change in pH values. No significant differences were observed in terms of pH between drinks prepared from different tea types (Table 3).

With time, the acetic acid content of the fermentation increased, regardless of the type of tea used to prepare kombucha. On the 14th day of fermentation, acetic acid concentration was the highest for all tested beverages (9071.02–9147.40 mg/L) (Table 3).

The refractometric analysis of sugar content showed that all of the tea types were characterised by the highest concentration of saccharose before the beginning of the fermentation process. When it comes to kombucha prepared with the use of black or white tea, with progressing fermentation the content of saccharose decreased, achieving the lowest value on the 14th day of fermentation (7.5 and 9.5 °Bx, respectively). However, in the case of kombucha made from red and green tea types, the content of saccharose decreased directly after the addition of sourdough, increasing and approaching initial values at the moment of measurement on the 7th day of fermentation. The continuation of the process caused a slow decrease in the content of saccharose in these samples (Table 3).

The concentration of alcohol increased with time, achieving maximum value on the 7th day of fermentation—from 3.0% to 3.5% depending on the tea type. Subsequently, a decrease in alcohol content was observed in all types of kombucha drink (14th day of fermentation).

In the case of most of the studied parameters, statistically significant differences were observed between the time of fermentation. The smallest statistically significant differences were observed between kombucha drinks prepared from various tea types using the same fermentation time (Table 3). Statistical analysis of the results showed significant correlations between the parameters characterising the basic chemical composition of kombucha (Table 4).

**Table 3.** The content of alcohol, sugar, pH and acidity in Kombucha tea. \* FDR  $p \leq 0.05$  between type of Kombucha (0, 1, 7, 14 days of fermentation),  $p \leq 0.05$  between particular subgroups: <sup>1</sup>—GK 0, <sup>2</sup>—GK 1, <sup>3</sup>—GK 7, <sup>4</sup>—GK 14, <sup>5</sup>—BK 0, <sup>6</sup>—BK 1, <sup>7</sup>—BK 7, <sup>8</sup>—BK 14, <sup>9</sup>—WK 0, <sup>10</sup>—WK 1, <sup>11</sup>—WK 7, <sup>12</sup>—WK 14, <sup>13</sup>—RK 0, <sup>14</sup>—RK 1, <sup>15</sup>—RK 7, <sup>16</sup>—RK 14.

Type of Beverage	Time Points (Day)	Alcohol [%]	pH	Saccharose [° Brix-g/100mL]	Acidity [mg acetic acid /L]
Green Tea Kombucha—GK	0	0.0 ± 0.00 <sup>*,2,4</sup>	5.54 ± 0.01 <sup>*,2,3,4,5</sup>	10.75 ± 0.00 <sup>*,3,4</sup>	20.12 ± 0.01 <sup>*,2,3,4</sup>
	1	0.2 ± 0.00 <sup>*,1,3</sup>	3.50 ± 0.04 <sup>*,1,3,4</sup>	9.75 ± 0.35 <sup>*,3,4,6</sup>	610.34 ± 0.02 <sup>*,1,3,4</sup>
	7	3.0 ± 0.00 <sup>*,2,4</sup>	2.61 ± 0.03 <sup>*,1,2,7</sup>	10.0 ± 0.00 <sup>*,1,2,4,7,11</sup>	7039.21 ± 0.12 <sup>*,1,2,7,11,15</sup>
	14	2.75 ± 0.50 <sup>*,1,3</sup>	2.49 ± 0.04 <sup>*,1,2</sup>	8.75 ± 0.00 <sup>*,1,3,4</sup>	9147.40 ± 0.31 <sup>*,1,2,12,16</sup>
Black Tea Kombucha—BK	0	0.0 ± 0.00	5.34 ± 0.03 <sup>*,1,6,7,8,9,13</sup>	11.0 ± 0.00 <sup>*,6,7</sup>	23.50 ± 0.01 <sup>*,6</sup>
	1	0.3 ± 0.00	3.54 ± 0.04 <sup>*,5,7,8</sup>	10.88 ± 0.18 <sup>*,5,7,8,2</sup>	501.02 ± 0.11 <sup>*,5</sup>
	7	3.25 ± 0.50 <sup>*,6,8,3,11,15</sup>	2.62 ± 0.03 <sup>*,3,5,6,8,15</sup>	9.5 ± 0.00 <sup>*,5,6,8,3</sup>	7039.08 ± 0.23 <sup>*,6,3,11,15</sup>
	14	2.0 ± 0.00 <sup>*,5,7,12,16</sup>	2.53 ± 0.03 <sup>*,5,6,7,12,16</sup>	7.5 ± 0.00 <sup>*,6,7</sup>	9083.03 ± 0.36 <sup>*,5,6,7,12,16</sup>
White Tea Kombucha—WK	0	0.0 ± 0.00	6.53 ± 0.05 <sup>*,5,10,11,12</sup>	10.75 ± 0.00	21.09 ± 0.01 <sup>*,10,11,12</sup>
	1	0.4 ± 0.00	3.56 ± 0.06 <sup>*,9,11,12</sup>	10.13 ± 0.18	620.13 ± 0.09 <sup>*,9,11,12</sup>
	7	3.5 ± 0.50 <sup>*,3,7</sup>	2.53 ± 0.05 <sup>*,9,10,12</sup>	10.13 ± 0.00 <sup>*,3</sup>	7048.06 ± 0.17 <sup>*,9,10,12,3,7</sup>
	14	3.0 ± 0.00 <sup>*,4,8</sup>	2.37 ± 0.05 <sup>*,8,9,10,11</sup>	9.5 ± 0.00	9132.20 ± 0.43 <sup>*,9,10,11,8,16</sup>
Red Tea Kombucha—RK	0	0.0 ± 0.00	5.58 ± 0.07 <sup>*,5,14,15,16</sup>	10.75 ± 0.00 <sup>*,14,15</sup>	20.42 ± 0.03 <sup>*,14,15,16</sup>
	1	0.4 ± 0.50	3.62 ± 0.01 <sup>*,13,15,16</sup>	10.25 ± 0.35 <sup>*,13,15,16</sup>	600.09 ± 0.26 <sup>*,13,15,16</sup>
	7	3.5 ± 0.50 <sup>*,3,7</sup>	2.38 ± 0.04 <sup>*,7,13,14</sup>	10.75 ± 0.00 <sup>*,13,14,16</sup>	7059.47 ± 0.75 <sup>*,7,13,14,16</sup>
	14	3.0 ± 0.00 <sup>*,4,8</sup>	2.32 ± 0.02 <sup>*,8,13,14</sup>	9.5 ± 0.00 <sup>*,14,15</sup>	9071.02 ± 0.62 <sup>*,4,8,13,14,15</sup>

**Table 4.** Statistically significant (at  $p \leq 0.05$ ) correlation ( $r$ ) between parameters for kombucha tea. \*  $p$  value  $\leq 0.05$ .

Correlations ( $r$ ) between Analysed Parameters				
Kombucha	Green Tea	Black Tea	White Tea	Red Tea
<b>Time vs</b>	Acidity ( $r = 0.85$ ) *	Acidity ( $r = 0.93$ ) *	Acidity ( $r = 0.99$ ) *	Acidity ( $r = 0.99$ ) *
	pH ( $r = 0.81$ ) *	pH ( $r = 0.96$ ) *	Alcohol ( $r = -0.88$ ) *	Alcohol ( $r = -0.88$ ) *
<b>Acidity vs</b>	Time ( $r = 0.85$ ) *	Time ( $r = 0.93$ ) *	pH ( $r = 0.99$ ) *	pH ( $r = 0.86$ ) *
	Alcohol ( $r = -0.61$ ) *	Saccharose ( $r = -0.52$ ) *	Time ( $r = 0.99$ ) *	Time ( $r = 0.99$ ) *
	Saccharose ( $r = -0.75$ ) *	pH ( $r = 0.88$ ) *	Alcohol ( $r = -0.93$ ) *	Alcohol ( $r = -0.90$ ) *
	pH ( $r = 0.73$ ) *		pH ( $r = 0.99$ ) *	pH ( $r = 0.82$ ) *
<b>Alcohol vs</b>	Acidity ( $r = -0.61$ ) *	Saccharose ( $r = -0.56$ ) *	Time ( $r = -0.88$ ) *	Time ( $r = -0.88$ ) *
	Saccharose ( $r = 0.65$ ) *		Acidity ( $r = -0.93$ ) *	Acidity ( $r = -0.91$ ) *
			Saccharose ( $r = -0.52$ ) *	pH ( $r = -0.65$ ) *
<b>Saccharose vs</b>	Acidity ( $r = -0.75$ ) *	Acidity ( $r = -0.52$ ) *	pH ( $r = -0.91$ ) *	
	Alcohol ( $r = -0.65$ ) *	Alcohol ( $r = -0.56$ ) *	Acidity ( $r = -0.52$ ) *	Alcohol ( $r = -0.72$ ) *
<b>pH vs</b>	Time ( $r = 0.81$ ) *	Time ( $r = 0.96$ ) *	pH ( $r = -0.47$ ) *	
	Acidity ( $r = 0.73$ ) *	Acidity ( $r = 0.88$ ) *	Time ( $r = 0.99$ ) *	Time ( $r = 0.86$ ) *
			Acidity ( $r = 0.99$ ) *	Alcohol ( $r = -0.65$ ) *
			Alcohol ( $r = -0.91$ ) *	

#### 4. Discussion

The popularity of fermented drinks is increasing as consumers perceive fermentation as a mild method for the preservation of food and value the products themselves for their health benefits. Kombucha, as a fermented tea drink, is consumed not only in Asia, where it originally comes from, but also increasingly often in Europe. It is mainly formed from black tea, but other forms of kombucha made from different tea variants, such as green, white or red tea, are becoming increasingly available on the market. Despite the fact that kombucha has been researched in detail in terms of its microbiological content and antibacterial properties, there are not enough studies regarding the various tea types and their health benefits. This is why our study includes different, most frequently consumed tea types (black, green, white and red) and this is why we analysed the content, antioxidant potential depending on the time of fermentation and the type of tea selected for the preparation of kombucha.

This study has demonstrated that the health benefits as well as the chemical content depend both on the type of tea as well as fermentation time. Kombucha is characterised by high antioxidant potential. Green tea was characterised by the most significant antioxidant properties, slightly lower potential was observed for red and white tea types, whereas black tea featured the lowest values. The same tendency was observed for kombucha prepared from a given tea type. In the case of DPPH, the fermentation process had an influence on the increase in antioxidant properties in reference to tea, and with subsequent days of fermentation the potential decreased regardless of the tea type. A reverse situation was observed in the case of the reductive potential (FRAP). Fermentation had an influence on the decrease in reductive properties with reference to tea. The highest reductive potential was observed for kombucha on the 7th day. Therefore, a strong positive correlation was observed between the time of fermentation and the reductive potential (FRAP) as well as polyphenol content. On the other hand, a negative correlation was observed between the time and the antioxidant potential (DPPH). The differences in the antioxidant potential measured by FRAP and DPPH methods are due to different mechanisms of both methods. In the latter method, the DPPH radical uses the free electron transfer reaction, and the FRAP method utilizes metal ions for oxidation. Additionally, the DPPH method does not allow for the determination of hydrophilic antioxidant activity. FRAP was primarily used to determine the absolute reduction in body fluid. Recently, it has also been adapted for plant-based antioxidant research. In our study, both methods showed high reproducibility. However, the DPPH method has been shown to be more stable [21].

These results are similar to those achieved by Gaggia et al. in a study where the highest antioxidant potential (DPPH) was observed in relation to green tea, slightly lower for white tea, and the lowest for red tea. However, in this case, the 7th day of fermentation had the most positive influence on this parameter. It should be highlighted that the authors did not study kombucha on day one. In all cases, the fermentation process increase the antioxidant properties of the drink [19]. An increase in the antioxidant potential of kombucha in comparison to tea was also observed in the study by Chakravorty et al. [22]. The DPPH and ABTS (2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) radicals' scavenging activity increased by 39.7% and 38.36%, respectively, after 21 days [22]. It was also observed that the microbiological content is the most diverse on the 7th day of fermentation. This might indicate that the increase in the diversity of microorganisms plays a significant role in the increase in the antioxidant properties of kombucha tea. Moreover, the change of the domination of yeast to lactic acid bacteria on the 7th day is also responsible for the increased antioxidant activity [22].

Tea, which is also the main ingredient of the drink, is rich in catechins-theaflavin and tearubigin. Polyphenols present in tea are responsible for the antioxidant activity of kombucha. A positive correlation was observed between the content of polyphenols and reductive potential. This study confirms the observations carried out by Chakravorty et al., in which an increase in polyphenols was observed during fermentation [22]. During fermentation, there is an increase in polyphenols, including flavonoids, whereas tearubigin is transformed into theaflavin, resulting in the change in kombucha's colour from dark to light with the progressing time of fermentation [22]. On the basis of our studies, it can be concluded that the general content of polyphenols depended on the type of



tea. The highest concentration was observed for green tea, slightly lower for red and white tea types, the lowest for black tea. Fermentation time had an influence on the increase in the content of these compounds. Furthermore, an increase in the content of polyphenols in kombucha in comparison to tea alone has also been observed. For kombucha prepared from green and black tea types, the content of polyphenolic compounds increased with the time of fermentation, achieving the highest concentration on the 14th day. Our studies confirm those of other authors. The highest antioxidant potential was also observed in green tea, but on the 7th day of fermentation (100.33 mg/g). Kombucha prepared from red tea included the smallest amount of polyphenols, but they were stable and their concentration did not change during the fermentation process. This kombucha included a lot of flavonoids [19]. The increase in the content of polyphenolic compounds can be associated with numerous reactions occurring during the fermentation of tea, e.g., the oxidation of polyphenolic compounds by some enzymes leads to the formation of catechins, flavonoids and other compounds with healthy properties, including antioxidant properties, which is the result of a microbial hydrolysis reaction [10]. Moreover, microorganisms such as *Candida tropicalis* are able to degrade various polyphenols [23]. Catechins included in the tea can be broken down through the activity of bacteria and yeast into simpler particles, increasing antioxidant strength [10,24]. In addition, fermentation induces the structural breakdown of plant cell walls, leading to the liberation or synthesis of various antioxidant compounds. These antioxidant compounds can act as free radical terminators, metal chelators, singlet oxygen quenchers or hydrogen donors. The production of protease,  $\alpha$ -amylase and some other enzymes might be influenced by fermentation possessing metal ion chelation activity [25].

Our study provides an extensive body of evidence that red tea and kombucha are good sources of polyphenols, among them flavonoids with undisputed antioxidant effects. Additionally, they help seal blood vessels, have anti-inflammatory properties and support immune system function [26]. Flavonoids, present in large quantities in red tea, can significantly contribute to its antioxidant properties. A good source of flavonoids also seems to be green tea and kombucha prepared from this variant. However, fermentation contributes to the degradation of this compound. Its highest concentration in red tea subjected to fermentation was observed on day 1 and day 14: 292.54 and 242.5 mg/L, respectively. The value for tea alone was 395.9 mg/L. In comparison, buckwheat—considered as one of the best sources of flavonoids—contains 62.30 mg/100 g of fresh weight of the resource. The tea drink available on the market included only 1.968 mg/L of the resource. Out of 14 of the studied infusions from various tea types, green tea included the highest content of flavonoids—37.13 mg/L [27].

Lactic fermentation is responsible for the breakdown of glucose, which results from the activity of bacteria of lactic fermentation. Another fermentation type is alcoholic fermentation. Yeast, a constituent of the drink's microflora, is responsible for the breakdown of glucose into ethyl alcohol with the appearance of carbon dioxide. Yeast consists of *Schizosaccharomyces pombe*, as well as *Candida krusei* and *Issatchenkia orientalis* [8]. In our study, on day 7, the highest concentration of alcohol was achieved with as much as 3.5% for kombucha prepared from white and red tea types, 3.25% for green tea and 3.0% for black tea. On the 14th day the content of alcohol slightly decreased in the case of all of the studied variants to the level of 2–3%. In a study by Gaggia et al., the content of alcohol on day 14 was higher—at the level of 5.83% for white tea, 4.18% for green tea and only 1.14% for black tea, but this depends on the fermentation conditions, such as temperature or microbiological composition [19]. In the next phase, *Acetobacter* bacteria [8] use ethyl alcohol as a substrate to create acetic acid. The dominating bacteria included in kombucha are the bacteria of acetic acid AAB: *Acetobacter xylinoides*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Bacterium gluconicum* and *Gluconobacter oxydans*. This is why on the 14th day of the fermentation process, the content of alcohol decreased, and there was an increase in acidity as well as the production of organic acids, including acetic acid. Acetic acid, which is the dominating acid present in a fermented solution, contributes to the decrease in pH from 5 to as low as 3 [10,28].

An important parameter that undergoes change during fermentation is pH and acidity, and thus the content of organic acids. The microorganisms present in SCOBY process the substances included in tea and sugar, producing various metabolites. This is why these parameters change with fermentation

time. In this study, the pH of teas was from 5.34 to 6.53. In the case of kombucha, there was a significant decrease in this parameter: from 2.31 to 2.53 on the 14th day of fermentation. There was also a small decrease in pH between the 7th and 14th day of fermentation, which indicates that the reactions responsible for the decrease in this parameter were inhibited. Our results are similar to the findings of other authors [29–31]. Chakravorty et al. observed that the initial pH before fermentation was about 5.03 and decreased abruptly to 2.28 after 7 days of fermentation [22]. It has to be remembered that consuming drinks with a very low pH may negatively influence the digestive system [32]. This is why the fermentation time of kombucha is important, as well as the amount of the consumed drink.

The organic acids present in kombucha include acetic, glucuronic, gluconic, tartaric, malic, citric, lactic, succinic and malonic acids [8,10]. The biochemical content of the drink may slightly differ due to the change of parameters, such as: the amount of sugar, the type and quantity of tea, temperature, pH and the time of fermentation. In this study, for all kombucha types, there was a significant increase in the content of acids during fermentation. The sudden production of organic acids occurred after the 7th day of fermentation. The content of acetic acid on the 14th day of fermentation was the highest for green tea (9147.40 mg/L) and white tea (9132.20 mg/L), the lowest for red tea (9071.02 mg/L) and black tea (9083.03 mg/L). These results correspond to those present in other studies. The research showed differences in metabolite content between the drinks prepared from black tea, green tea and rooibos on different days of fermentation [19]. The content of acetic acid on the 7th day of fermentation present in a study by Gaggia et al. was the highest in white tea (9.18 mg/mL) and green tea (7.65 mg/mL), while the lowest in rooibos (4.89 mg/mL) [19]. Shahbazi et al. determined that acetic acid was the main acid present in kombucha, and its content significantly decreased during fermentation [29]. Chen and Liu (2000) observed that the concentration of acetic acid increased to 8000 mg/L at the end of the storage period Jayabalan et al. (2007) studied the changes in organic acids of kombucha tea during fermentation [10,33]. They observed that green tea was characterised by the highest content of acetic acid (9500 mg/L) on the 15th day of fermentation [10]. The concentration of lactic acid significantly increased during fermentation. Its concentration was at the level of 145.71 mg/L on the 16th day of fermentation [29]. Malbaša, Lončar and Djurić (2008) used molasses as a source of sugar for the fermentation of kombucha. The content of lactic acid was from 0.16 to 0.4 g/L [34]. It is also worth highlighting that the pH of the solution and the presence of some organic acids determines the growth of microorganisms, and so also the chemical content of the drink [19]. Low pH and high acidity enable the growth of only those microbes that are able to colonise such a niche, so those that can provide a certain kind of protection against unwanted microorganisms [35].

Sugar content in kombucha also changes in time and depends on fermentation. The initial increase in reducing sugar content can be attributed to the hydrolysis of saccharose into glucose and fructose by yeast. With the progressing fermentation, yeast uses sugar in an oxygen-free way to produce ethanol [10]. In our study, the content of sugar decreased with the time of fermentation. The highest decrease (32%) was observed for black tea vs. kombucha on the 14th day of fermentation. Gaggia et al. checked the content of glucose, fructose and saccharose in kombucha prepared from black, green and red tea types on the 7th and 14th day of fermentation. The content of complex carbohydrates, i.e., saccharose, decreased during fermentation, while the content of simple carbohydrates—glucose—increased. The concentration of fructose increased during fermentation. The highest content of sugars on the 14th day of fermentation was observed in kombucha prepared from red tea [19].

In this study, a strong positive correlation was observed between time, acetic acid and pH, whereas a negative correlation was observed between acetic acid and the content of alcohol and sugar. The observed correlations confirm the changes occurring in kombucha during the process of fermentation. The increase in acidity and pH with the time of fermentation, as well as the decrease in alcohol and sugar content are associated with the production of organic acids and the use of substrates for their production.

Kombucha has many health-promoting properties, including antioxidant ones. Therefore, to support one's antioxidative response, a regular diet should include kombucha, especially in cases of increased

exposure to mental and physical stress. Considering the antioxidant properties of kombucha, the most valuable one is derived from red and green tea. However, longer fermentation leads to a decrease in the pH of the drink, which is why consumption of kombucha should be avoided by people suffering from ulcers or gastrointestinal reflux. Of note, kombucha may contain lead from an inadequate vessel, which may be another health hazard [36,37].

## 5. Conclusions

Kombucha, the fermented tea, has strong antioxidant properties associated with high polyphenol content, particularly flavonoids. Therefore, it should be consumed by people particularly exposed to oxidative stress. The antioxidant activity of kombucha is diverse and depends on the type and composition of the tea infusion before fermentation and on the content of SCOBY, which determines the character of the forming metabolites and conditions the type of the forming products of polyphenol compound transformation. A particularly rich source of antioxidants, especially flavonoids, are red and green tea types on the 1st and 14th day of fermentation. Therefore, the selection of tea other than black tea, and the subsequent subjection to fermentation, are beneficial to human health.

**Author Contributions:** Conceptualization, K.J. (Karolina Jakubczyk) and K.J. (Katarzyna Janda); Data curation, J.K. (Joanna Kochman); Funding acquisition, K.J. (Karolina Jakubczyk) and K.J. (Katarzyna Janda); Investigation, K.J. (Karolina Jakubczyk) and J.K. (Justyna Kałduńska); Methodology, K.J. (Karolina Jakubczyk) and J.K. (Justyna Kałduńska); Project administration, K.J. (Karolina Jakubczyk) and K.J. (Katarzyna Janda); Resources, J.K. (Joanna Kochman); Supervision, K.J. (Karolina Jakubczyk) and K.J. (Katarzyna Janda); Writing—original draft, K.J. (Karolina Jakubczyk); Writing—review & editing, K.J. (Karolina Jakubczyk) and J.K. (Joanna Kochman). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The project is financed from the program of the Minister of Science and Higher Education under the name “Regional Initiative of Excellence” in 2019–2022 project number 002/RID/2018/19 amount of financing 12 000 000 PLN.

**Acknowledgments:** The authors are thankful to company Naturalnie naturalni (<https://naturalnienaturalni.com/>) for providing the materials (Kombucha SCOBY) for this research.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review. *Ann. Bot.* **2003**, *91*, 179–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jakubczyk, K.J.P.; Piotrowska, G.; Janda, K. Characteristics and biochemical composition of kombucha-fermented tea. *Med. Ogólna Nauki Zdrowiu* **2020**. [[CrossRef](#)]
3. Chandrakala, S.K.; Lobo, R.O.; Dias, F.O. 16—Kombucha (Bio-Tea): An Elixir for Life? In *Nutrients in Beverages*; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 591–616.
4. Kim, J.; Adhikari, K. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. *Beverages* **2020**, *6*, 15. [[CrossRef](#)]
5. Shahidi, F.; Ambigaipalan, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods* **2015**, *18*, 820–897. [[CrossRef](#)]
6. Jakubczyk, K.; Kałduńska, J.; Dec, K.; Kawczuga, D.; Janda, K. Antioxidant properties of small-molecule non-enzymatic compounds. *Pol. Merkur. Lekarski* **2020**, *48*, 128–132.
7. Blanc, P.J. Characterization of the tea fungus metabolites. *Biotechnol. Lett.* **1996**, *18*, 139–142. [[CrossRef](#)]
8. Villarreal-Soto, S.A.; Beaufort, S.; Bouajila, J.; Souchard, J.-P.; Taillandier, P. Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *J. Food Sci.* **2018**, *83*, 580–588. [[CrossRef](#)]
9. Kapp, J.M.; Sumner, W. Kombucha: A systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Ann. Epidemiol.* **2019**, *30*, 66–70. [[CrossRef](#)]
10. Jayabalan, R.; Malini, K.; Sathishkumar, M.; Swaminathan, K.; Yun, S.-E. Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **2010**, *19*, 843–847. [[CrossRef](#)]
11. Ivanišová, E.; Meňhartová, K.; Terentjeva, M.; Harangozo, L.; Kántor, A.; Kačániová, M. The evaluation of chemical, antioxidant, antimicrobial and sensory properties of kombucha tea beverage. *J. Food Sci. Technol.* **2020**, *57*, 1840–1846. [[CrossRef](#)]

12. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
13. Pekkarinen, S.S.; Stöckmann, H.; Schwarz, K.; Heinonen, I.M.; Hopia, A.I. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3036–3043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Benzie, I.F.; Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 15–27. [[PubMed](#)]
16. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
17. Hu, S.; Yuan, C.; Zhang, C.H.; Wang, P.; Li, Q.; Wan, J.; Chang, H.; Ye, J.; Guo, X. Comparative Study of Total Flavonoid Contents from the Different Tissues and Varieties of *Abelmoschus Esculentus*. *Int. J. Med. Sci. Biotechnol.* **2013**, *1*, 26–30.
18. Pełkal, A.; Pyrzyńska, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 1776–1782. [[CrossRef](#)]
19. Gaggià, F.; Baffoni, L.; Galiano, M.; Nielsen, D.S.; Jakobsen, R.R.; Castro-Mejía, J.L.; Bosi, S.; Truzzi, F.; Musumeci, F.; Dinelli, G.; et al. Kombucha Beverage from Green, Black and Rooibos Teas: A Comparative Study Looking at Microbiology, Chemistry and Antioxidant Activity. *Nutrients* **2018**, *11*, 1. [[CrossRef](#)]
20. Crafac, M.; Mikkelsen, M.B.; Saerens, S.; Knudsen, M.; Blennow, A.; Lowor, S.; Takrama, J.; Swiegers, J.H.; Petersen, G.B.; Heimdal, H.; et al. Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *167*, 103–116. [[CrossRef](#)]
21. Schlesier, K.; Harwat, M.; Böhm, V.; Bitsch, R. Assessment of Antioxidant Activity by Using Different In Vitro Methods. *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 177–187. [[CrossRef](#)]
22. Chakravorty, S.; Bhattacharya, S.; Chatzinotas, A.; Chakraborty, W.; Bhattacharya, D.; Gachhui, R. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *220*, 63–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Ettayebi, K.; Errachidi, F.; Jamaï, L.; Tahri-Jouti, M.A.; Sendide, K.; Ettayebi, M. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *223*, 215–219. [[CrossRef](#)]
24. Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I. Chemistry of Secondary Polyphenols Produced during Processing of Tea and Selected Foods. *Int. J. Mol. Sci.* **2009**, *11*, 14–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hur, S.J.; Lee, S.Y.; Kim, Y.-C.; Choi, I.; Kim, G.-B. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chem.* **2014**, *160*, 346–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hosseinzadeh, H.; Nassiri-Asl, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J. Endocrinol. Investig.* **2014**, *37*, 783–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Price, K.R.; Rhodes, M.J.C.; Barnes, K.A. Flavonol Glycoside Content and Composition of Tea Infusions Made from Commercially Available Teas and Tea Products. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2517–2522. [[CrossRef](#)]
28. ZhenJun, Z.; YuCheng, S.; HuaWei, W.; CaiBi, Z.; XianChun, H.; Jian, Z. Flavour chemical dynamics during fermentation of kombucha tea. *Emir. J. Food Agric.* **2018**, *30*, 732–741.
29. Shahbazi, H.; Hashemi Gahrue, H.; Golmakani, M.; Eskandari, M.H.; Movahedi, M. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6*, 2568–2577. [[CrossRef](#)]
30. Changes in Major Components of Tea Fungus Metabolites during Prolonged Fermentation—Chen—2000—Journal of Applied Microbiology—Wiley Online Library. Available online: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x> (accessed on 18 June 2019).
31. Sreeramulu, G.; Zhu, Y.; Knol, W. Kombucha Fermentation and Its Antimicrobial Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2589–2594. [[CrossRef](#)]
32. Malbaša, R.V.; Lončar, E.S.; Vitas, J.S.; Čanadanović-Brunet, J.M. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. *Food Chem.* **2011**, *127*, 1727–1731. [[CrossRef](#)]

33. Chen, C.; Liu, B.Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 834–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Malbaša, R.V.; Lončar, E.S.; Djurić, M. Comparison of the products of Kombucha fermentation on Sucrose and molasses. *Food Chem.* **2008**, *106*, 1039–1045. [[CrossRef](#)]
35. Greenwalt, C.J.; Steinkraus, K.H.; Ledford, R.A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 976–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Jayabalan, R.; Malbaša, R.V.; Lončar, E.S.; Vitas, J.S.; Sathishkumar, M. A Review on Kombucha Tea—Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2014**, *13*, 538–550. [[CrossRef](#)]
37. Srinivasan, R.; Smolinske, S.; Pharm, D.; Greenbaum, D. Probable Gastrointestinal Toxicity of Kombucha Tea. *J. Gen. Intern. Med.* **1997**, *12*, 643–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).