

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Umum Nenas

Tanaman nenas berbentuk semak dan hidupnya bersifat tahunan. Bagian utama dari buah nenas adalah: akar, batang, daun, bunga, buah, dan tunas-tunas. Nenas diklasifikasikan sebagai Kingdom: Plantae (tumbuh-tumbuhan), divisi: spermatophyta (tumbuhan berbiji), kelas: Angiospermae (berbiji tertutup), ordo: farinosae (Bromoliales), Genus : Anenas dan spesies: *Anenas comosus* (L) Merr.



Gambar 1 : Buah nenas

Rasa buah nenas manis, selain dikonsumsi dalam keadaan segar buah nenas banyak juga diolah menjadi berbagai macam makanan dan minuman (Rukmana, 1996).

Salah satu komoditas non migas dari sektor agrikultural disamping mangga, jeruk, pepaya, dan pisang yang dihasilkan oleh hampir semua provinsi di Indonesia adalah nenas. Pada tahun 2000 dihasilkan 393.299 ton buah nenas segar dari berbagai tempat seperti: Jawa Timur (27%), Jawa Barat (21%), Sumatera Selatan (20%), dan Riau (17%). Jumlah ekspor nenas kaleng Indonesia pada tahun 1999 mencapai sekitar 132.000 ton, diantaranya ke Amerika, Singapura, Jerman, dan Jepang. Salah satu produk olahan nenas adalah nenas kaleng yang diproduksi oleh beberapa Negara diantaranya adalah Thailand (39%), Filipina (23%),

Indonesia (13%), dan Kenya (8%) yang memberikan kontribusi lebih kurang 80% dari jumlah total produksi dunia (Abdullah dan Yefta, 2004).

Buah nenas juga bermanfaat dan berkhasiat untuk sebagai obat penyembuh beberapa penyakit. Hasil penelitian Direktorat Gizi Depkes R.I (1981) kandungan gizi buah nenas segar tiap 100 gram per bahan adalah:

Tabel 1: Kandungan gizi buah nenas segar tiap 100 gram bahan

Kandungan gizi (nutrisi)	Banyaknya
Kalori	52,00 Kal
Protein	0,40 gram
Lemak	0,20 gram
Karbohidrat	16,00 gram
Fosfor	11,00 mgram
Zat besi	0,30 mgram
Vitamin A	130,000 S.I
Vitamin B 1	0,80 mgram
Vitamin C	24,00 mgram
Air	85,30 gram
Bagian dapat dimakan (bdd)	53,00 %

Kadar tepung dari batang nenas yang tua berkisar antara 10 - 15 % dari berat segar. Serat pada bagian tanaman nenas terutama serat daun, dapat dimanfaatkan sebagai serat tekstil (Rukmana, 1996).

Pengolahan berbagai macam ragam buah nenas bertujuan untuk:

1. Resiko busuk dan harga rendah, menyelamatkan produksi yang melimpah pada saat panen raya.
2. Meningkatkan nilai tambah, nilai bentuk dan nilai guna dari produk tersebut.
3. Menunjang agroindustri baik di pedesaan maupun di kota sekaligus menambah peluang usaha dan lapangan kerja (Rukmana, 1996).

2.2. Tinjauan Umum Tentang *Kombucha*

Nama *Kombucha* diambil dari dua kata, yaitu kata “*kombu*” dan “*cha*” diambil dari bahasa cina yang bermakna “teh”. Di Indonesia sendiri, teh *Kombucha* telah dimanfaatkan sebagai minuman kesehatan sejak tahun 1930-an. Masyarakat Indonesia lebih mengenal dengan sebutan *teh kombu*. Di beberapa



daerah, orang menyebut ragi penghasil teh ini dengan sebutan “jamur dipo”. Dari penampilan fisiknya, koloni kombucha sebagai pelaku fermentasi pada pembuatan kombucha menyerupai lembaran gelatin yang berwarna putih dengan ketebalan 0,3-1,2 cm dan terbungkus selaput liat (Naland, 2008).

Kultur kombucha mengandung berbagai macam bakteri dan khamir, diantaranya adalah *Acetobacter xylinum*, *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Gluconibakter*, *Brettanomyces bruxellensis*, *B. intermedius*, *Candida fomatata*, *Mycoderma*, *Mycotorula*, *Pichia*, *saccharomyces cerevisiae* dan lain-lain. Selama fermentasi kultur kombucha akan menghasilkan sejumlah alkohol, karbondioksida, Vitamin serta berbagai jenis asam organik yang sangat penting bagi metabolisme manusia, seperti asam asetat, asam glukonat, asam glukoronat, asam oksalat dan asam laktat (Hidayat dkk, 2006).

Kombucha adalah suatu pertumbuhan yang simbiotik bagi bakteri *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, dan *glukonicum*. Sukrosa akan terpecah menjadi glukosa dan fruktosa. Metabolisme dari fruktosa akan menghasilkan etanol yang kemudian oleh *Acetobacter* dioksidasi menjadi asam asetat (Sreeramulu dkk. 2000).

Proses fermentasi pada *Kombucha* dimulai ketika kultur mengubah glukosa menjadi alkohol dan CO₂ kemudian bereaksi dengan air membentuk asam karbonat. Faktor-faktor yang harus diperhatikan selama proses fermentasi pada *Kombucha* adalah:

1. Ketersediaan nutrisi, meliputi unsur C, N, P, K
2. pH medium sekitar 5,5
3. suhu fermentasi 23-27⁰C dengan toleransi 18-35⁰C
4. Ketersediaan udara namun tidak dalam aerasi aktif.
5. Tidak boleh ada getaran atau guncangan.
6. Tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung.

Semakin lama fermentasi maka akan semakin asam dan rasa manis akan semakin berkurang (Hidayat dkk. 2006).



2.3. Fermentasi

Fermentasi adalah salah satu reaksi oksidasi-reduksi di dalam sistem biologi yang menghasilkan energy sebagai donor dan aseptor elektron digunakan senyawa organik. Senyawa organik yang biasanya digunakan adalah karbohidrat dalam bentuk glukosa. Senyawa tersebut akan diubah oleh reaksi reduksi dengan katalis enzim menjadi suatu bentuk lain misalnya aldehida, dan dapat dioksidasi menjadi asam (Winarno dan Fardiaz, 1993). Contoh perubahan kimia dari fermentasi meliputi pengasaman susu, dekomposisi pati, gula menjadi alkohol dan karbon dioksida, serta oksidasi senyawa nitrogen organik.

Proses fermentasi mempunyai enam komponen dasar, yaitu:

1. Susunan medium yang digunakan selama pengembangan inokulum dan di dalam fermentor.
2. Sterilisasi medium, fermentor, dan peralatan yang lain.
3. Aktivitas produksi, pemanfaatan kultur murni, jumlah inokulum untuk produksi.
4. Pertumbuhan mikrobial dalam fermentor produksi pada kondisi optimum untuk pembentukan hasil.
5. Ekstraksi produk dan pemurnian.
6. Penanganan limbah yang dihasilkan selama proses (Hidayat dkk. 2006).

Hasil fermentasi terutama tergantung pada jenis bahan pangan (substrat), macam mikroba dan kondisi di sekelilingnya yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme tersebut (Winarno dan Fardiaz, 1993). Industri fermentasi dalam pelaksanaan prosesnya dipengaruhi oleh beberapa faktor, yang meliputi :

1. Mikrobial

Fermentasi biasanya dilakukan dengan menggunakan kultur murni yang dihasilkan di laboratorium, namun ada juga yang tidak menggunakan kultur murni seperti ragi yang dijual di pasaran. Syarat dari mikrobial yang digunakan dalam fermentasi diantaranya mampu menghasilkan perubahan-perubahan yang dikehendaki secara cepat dan dengan hasil yang besar. Mikrobial haruslah yang bukan patogen bagi manusia maupun hewan, terkecuali untuk produksi bahan kimia tertentu.

2. Bahan dasar

Bahan dasar untuk kebutuhan fermentasi dapat berasal dari hasil pertanian, perkebunan, maupun limbah industri. Bahan dasar yang umum digunakan diantaranya adalah jerami, dedak, ampas tebu, air limbah, sampah sebagai komponen pupuk dan lain-lain. Bahan dasar haruslah memenuhi syarat-syarat sebagai berikut:

- Mudah didapat
- Jumlahnya besar
- Murah harganya
- Bila diperlukan ada penggantinya

3. Sifat-sifat proses

Sifat-sifat proses harus disesuaikan dengan kondisi yang dibutuhkan mikrobia di dalam melakukan metabolismenya. Kondisinya dapat aerob ataupun anaerob, sedangkan bentuk mediumnya dapat cair ataupun padat. Perbedaan kondisi yang dibutuhkan oleh mikrobia dalam proses industri juga akan menentukan tipe fermentor, optimasi lingkungan (pH, aerasi, suhu, kadar nutrien), jenis alat bantu (sumber air, kompresor dan sebagainya) dan cara pengambilan hasil (Hidayat dkk, 2006)

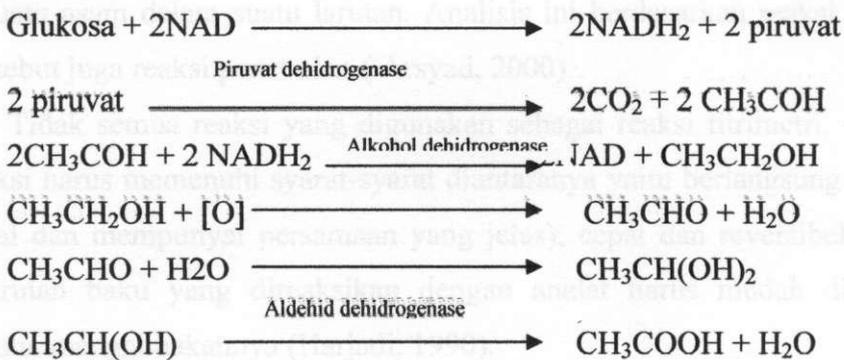
2.4. Asam Asetat

Asam asetat adalah senyawa yang sangat penting, asam ini banyak digunakan dalam industri makanan, industri plastik, industri tekstil dan obat-obatan. Asam asetat dihasilkan dari sintesis butanol, etanol dan lain-lain atau dari fermentasi aerobik dari gula (Tammali, 2003). Asam asetat merupakan cairan yang tidak berwarna dengan bau tajam. Asam asetat mempunyai berat jenis 1,04 g/mL dan titik didih $118,1^{\circ}\text{C}$ pada tekanan 1 atm. Daya larut yang dimiliki sebanding dengan air, alkohol, gliserol, eter pada suhu kamar (Fessenden, 1989).

Fermentasi asam asetat sangat tergantung pada kadar alkohol substrat dan aerasi. Bila kadar alkohol 14% atau lebih maka akan terbentuk suatu lapisan zooglea yang dapat mengakibatkan sukarnya terjadi proses oksidasi menjadi asam asetat. Beberapa metode pembuatan asam asetat adalah, Metode lambat, metode cepat dan bentuk modifikasi (Hidayat dkk, 2006).

Pada saat sekarang ini orang-orang lebih banyak menggunakan bentuk modifikasi. Pada metode ini asam asetat dapat dihasilkan dari senyawa etanol atau dari bahan-bahan yang mengandung senyawa tersebut melalui proses oksidasi biologis. Mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi asam asetat adalah *Acetobacter sp* dan *Gluconobacter sp* yang dikarakterisasikan oleh kemampuannya mengoksidasi gula, alkohol dan aldehyd. (Hidayat dkk, 2006).

Mekanisme reaksi pembentukan asam asetat dari etanol oleh *Acetobacter sp* sangat sederhana bila dibandingkan dengan proses biologi lainnya. Proses ini melibatkan satu macam enzim yaitu aldehyd dehidrogenase yang terdiri dari dua reaksi oksidasi (Hadi dan Rahayu, 2001). Persamaan reaksi kimia dari proses tersebut adalah:



Faktor lingkungan yang berperan penting terhadap kecepatan fermentasi asam asetat meliputi suhu (28⁰C-34⁰C), pH (5-7), Komposisi inokulum, kecepatan aerasi , Komposisi etanol (Hidayat dkk. 2006).

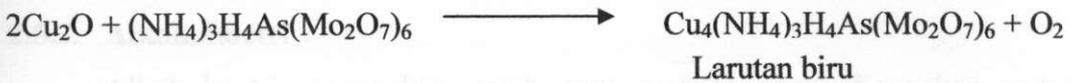
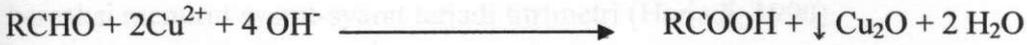
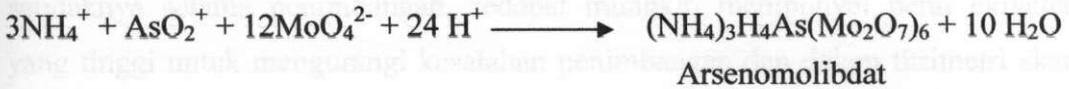
2.5. Teori analisis

2.5.1. Metode Nelson Somogyi

Dalam alkali semua monosakarida dan beberapa disakarida dapat bertindak sebagai senyawa-senyawa pereduksi dan dengan mudah teroksidasi oleh beberapa reagen misalnya tembaga (Cu²⁺). Salah satu metode yang umum digunakan adalah reduksi ion cupri (Cu²⁺) menjadi cupro (Cu⁺) dalam larutan alkali membentuk Cu(OH)₂ yang dengan pemanasan akan diubah menjadi endapan merah bata (Cu₂O). Untuk mencegah pengendapan reagen Cu²⁺ dalam larutan alkali digunakan sitrat atau tartarat. Dalam metoda Nelson-Samogyi, hasil reduksi ion cupri oleh glukosa atau gula pereduksi lainnya dalam suasana basa



dengan arsenomolibdat memberikan warna biru. Absorpsi larutan ini diukur pada panjang gelombang 500 nm (Green III dkk, 1989).



2.5.2. Titrimetri

Salah satu metode yang tergolong titrimetri adalah alkalimetri. Alkalimetri adalah suatu analisis atau penetapan suatu kadar secara volumetri atau jumlah total suatu asam dalam suatu larutan. Analisis ini berdasarkan reaksi asam basa dan disebut juga reaksi penetralan (Arsyad, 2000).

Tidak semua reaksi yang digunakan sebagai reaksi titrimetri, oleh sebab itu reaksi harus memenuhi syarat-syarat diantaranya yaitu berlangsung sempurna, (tunggal dan mempunyai persamaan yang jelas), cepat dan reversibel, indikator dan larutan baku yang direaksikan dengan analat harus mudah didapat dan sederhana menggunakannya (Harjadi, 1990).

Pada dasarnya reaksi asam basa disebut reaksi penetralan karena ion H^+ dari asam akan bereaksi dengan ion OH^- dari basanya membentuk molekul yang netral dan disebut titik ekuivalen. Untuk mengamati titik ekuivalen dipakai indikator yaitu zat yang mempunyai warna tertentu dalam suatu daerah pH, dimana perubahan warna terjadi di sekitar titik ekuivalen. Saat terjadi perubahan warna itu disebut titik akhir (Syukri, 1999). Titik akhir terlihat karena adanya perubahan: Warna, yaitu larutan tidak bewarna menjadi warna tertentu, atau larutan bewarna menjadi tak bewarna atau, larutan bewarna berubah menjadi warna lain. Selanjutnya karena adanya kekeruhan yaitu larutan keruh menjadi jernih atau sebaliknya.

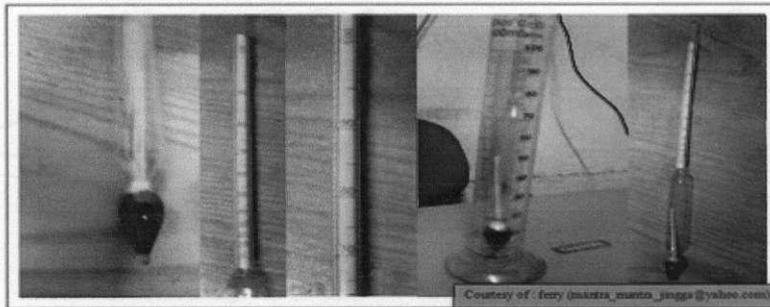
Dalam alkalimetri dibutuhkan suatu standar basa karena yang akan ditentukan adalah asam. Biasanya standar yang digunakan adalah larutan standar sekunder yaitu larutan standar yang komposisinya dapat diketahui melalui standarisasi menggunakan standar primer. Standar primer adalah bahan yang komposisi larutannya dapat ditentukan dari berat bahan yang sangat murni.



Syarat – syarat yang diperlukan oleh bahan baku primer adalah: Sangat murni dan mudah diperoleh, mudah diperiksa kemurniaannya, stabil dalam keadaan biasa setidaknya selama penimbangan, sedapat mungkin mempunyai berat ekuivalen yang tinggi untuk mengurangi kesalahan penimbangan dan dalam titrimetri akan bereaksi menurut syarat-syarat terjadi titrimetri (Harjadi, 1990).

2.5.3. Alkoholmetri

Alkoholmetri merupakan salah satu metode yang digunakan untuk penetapan senyawa alkohol dalam hal ini adalah metil alkohol (persentasi dalam berat atau dalam volume) dalam larutan air, penentuan kadar ini digunakan alat dengan nama alkoholmeter (Maludzinska, 1990).



Gambar 2 : Alkoholmeter

Alkoholmeter disebut juga hydrometer yang berfungsi untuk mengukur berat jenis (specific gravity) suatu larutan/cairan. Sedangkan dalam konteks alkoholmeter, jenis hydrometer ini sebenarnya secara spesifik digunakan untuk mengukur Komposisi etanol dalam air. Misalnya, jika kita memiliki cairan alkohol 70% berat maka ketika alkoholmeter ini dicelupkan dalam cairan tersebut permukaan cairan akan menunjukkan angka 70 pada skala alkoholmeter. Jika dicelupkan pada air murni, maka permukaan cairan akan menunjukkan angka 0 pada skala (http://ferry_atsiri.blogspot.com/2007/12/alkoholmetermeterlak.html).

2.5.4. Spektrofotometri

Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif zat-zat bewarna maupun zat-zat takbewarna :

1. Penggunaan pada zat bewarna

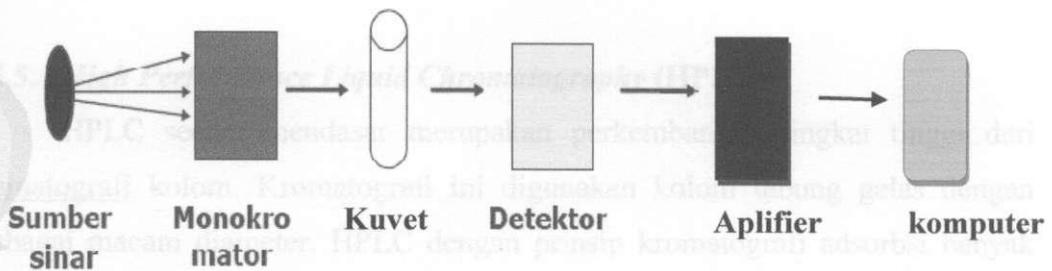
Analisis spektrofotometer dapat digunakan untuk setiap senyawa organik yang mengandung gugus kromofor. Sejumlah zat anorganik yang berwarna dan dapat mengabsorpsi sinar dapat ditentukan secara langsung.

Contoh: Ion nitrit, nitrat, kromat, molekul iodium dan lain-lain.

2. Penggunaan pada zat tak berwarna

Banyak pereaksi dapat bereaksi secara selektif dengan zat-zat (produk) yang mengabsorpsi pada panjang gelombang tertentu, zat-zat pengomplek banyak digunakan untuk penentuan zat-zat anorganik yang secara langsung tidak menghasilkan warna.

Secara umum komponen dasar dari suatu alat spektrofotometri sinar tampak adalah:



Gambar 3: Bagan alir alat spektrofotometer

Keterangan fungsi alat dari bagan di atas adalah:

1. Sumber sinar yang dipakai harus kontiniu dan sesuai dengan spektrum daerah sinar tampak (400-800 nm).
2. Monokromator
Suatu piranti yang berfungsi untuk merubah sinar polikromatis menjadi monokromatis.
3. Kuvet
Sebagai wadah untuk blangko, standar ataupun sampel.
4. Detektor
Untuk merubah energi sinar menjadi signal listrik.
5. Amplifier
Berfungsi untuk memperkuat signal listrik agar dapat dibaca oleh alat baca.
6. Komputer
Untuk membaca data-data hasil pengukuran.

Secara garis besar prinsip dari spektrofotometer adalah sinar polikromatis yang berasal dari sumber sinar akan disejajarkan oleh lensa kemudian masuk menuju prisma yang telah diatur sesuai dengan panjang gelombang sampel yang kita uji, sehingga dihasilkan sinar monokromatis. Sinar dengan panjang gelombang yang sesuai dengan sampel akan melewati celah keluar sedangkan sinar dengan panjang gelombang yang tidak sesuai akan tertahan. Oleh celah keluar sinar dengan panjang gelombang yang sesuai akan melewati larutan berwarna yang berada dalam kuvet, maka sinar tersebut akan diserap sebagian dan sebagian lagi akan diteruskan. Sinar yang diteruskan akan ditangkap oleh detektor dan diubah menjadi signal listrik yang diperkuat oleh amplifier kemudian diteruskan ke alat baca. Pada alat baca akan tertera data dalam %T atau absorban (A) (Khopkar, 1990).

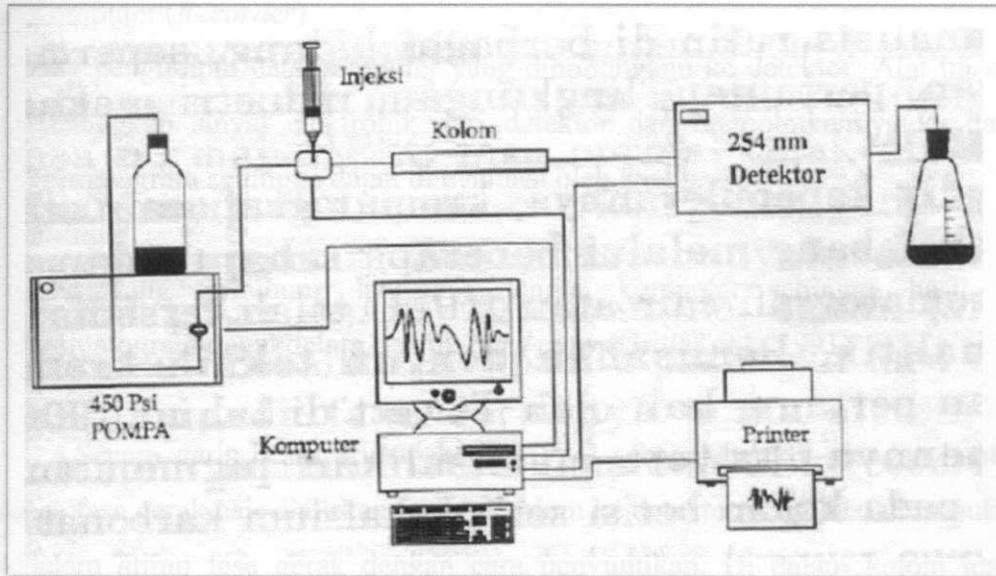
2.5.5. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

HPLC secara mendasar merupakan perkembangan tingkat tinggi dari kromatografi kolom. Kromatografi ini digunakan kolom tabung gelas dengan berbagai macam diameter. HPLC dengan prinsip kromatografi adsorpsi banyak digunakan pada industri farmasi dan pestisida. Zat-zat dengan kepolaran berbeda yaitu antara sedikit polar sampai polar dapat dipisahkan dengan HPLC berdasarkan partisi cair-cair (Khopkar, 1990). HPLC dapat dipakai sebagian besar senyawa tidak atsiri, dapat juga untuk senyawa anorganik yang sebagian besar tidak atsiri. Berdasarkan kepolaran fasa diam dan fase gerak HPLC dibagi dua yaitu fasa normal dan fasa terbalik. Jika fase yang lebih polar itu adalah fase diam, maka disebut kromatografi normal. Jika fase yang kepolarannya lebih rendah adalah fase diam maka dikenal sebagai kromatografi fasa balik (Gritter, 1991).

Sistim elusi pada HPLC ada 2 yaitu elusi isokratik dan elusi gradient. Dikatakan elusi isokratik jika komposisi pelarut tidak berubah selama satu percobaan kromatografi. Sedangkan elusi gradient jika komposisi pelarut berubah selama satu percobaan kromatografi (Day dan Underwood, 2002). Secara umum komponen dasar dari HPLC dapat dilihat pada gambar 4.

Karakteristik detektor yang baik adalah sensitif, stabilitas dan ketertulangan tinggi, respon yang linier terhadap konsentrasi, waktu respon pendek sehingga tidak bergantung kecepatan alir, mudah dipelihara dan merusuk capaian.





Gambar 4 : Bagan alir alat HPLC (Sumber: Hendayana, 2006)

Keterangan fungsi dari dari bagan alir alat HPLC:

1. Wadah fasa gerak (*Reservoir*)

Wadah fasa gerak menyimpan sejumlah fasa gerak yang secara langsung berhubungan dengan sistim.

2. Pompa (*Pump*)

Pompa berfungsi untuk mengalirkan fase gerak cair melalui kolom. Pompa yang digunakan harus memenuhi persyaratan menghasilkan tekanan sampai 600 psi, kecepatan alir berkisar antara 0,1-10 mL/menit dan bahan tahan korosi.

3. Tempat injeksi sampel (*Injector*)

Cuplikan disuntikan melalui septum karet, atau plastik dengan semprit dan jarum asalkan tekanan balik kecil dari 1500 psi).

4. Kolom

Kolom merupakan jantung dari Instrumen HPLC karena proses pemisahan terjadi di sini. Ukuran kolom untuk tujuan analitik berkisar antara panjang 10 hingga 25 cm diameter 3 hingga 9 mm.

5. Detektor

Karakteristik detektor yang baik adalah sensitif, stabilitas dan keterulangan tinggi, respon yang linier terhadap solut, waktu respon pendek sehingga tidak bergantung kecepatan alir, mudah dioperasikan dan merusak cuplikan.

6. Komputer (*Recorder*)

Alat pengumpul data komputer yang dihubungkan ke detektor. Alat ini akan menangkap sinyal elektronik dari detektor dan memplotkannya ke dalam kromatogram sehingga dapat di evaluasi oleh analis.

7. Printer

Alat yang terhubung langsung dengan komputer sehingga hasil dari kromatogram dapat dalam bentuk *hard copy* (Gritter dkk, 1991)

Secara garis besar prinsip kerja HPLC sebagai berikut, dengan bantuan pompa fasa gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan di masukkan ke dalam aliran fase gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran, karena perbedaan kekuatan interaksi antara solute-solut terhadap fasa diam. Solut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom terlebih dahulu. Sebaliknya, solut yang kuat berinteraksi dengan fasa diam maka solut tersebut akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram (Hendayana, 2006)

2.5.6. Destilasi

Destilasi merupakan suatu metode pemisahan dua atau lebih senyawa berdasarkan beda titik didihnya. Jika suatu campuran dipanaskan maka komponen yang titik didihnya lebih rendah akan menguap terlebih dahulu. Proses destilasi meliputi proses pendidihan suatu zat cair senyawa tersebut dan pengembunan uapnya (Syukri, 1999).

Pemisah atau pemurni cairan oleh penguapan dan kondensasi adalah langkah yang sangat penting, secara garis besar. Destilasi dapat dibagi sebagai berikut:

1. Destilasi sederhana.

Merupakan metode pemisahan cairan dengan titik didih dibawah $40-150^{\circ}\text{C}$ dengan beda titik didih 80°C . Destilasi ini terjadi satu kali penguapan, satu kali kondensasi

2. Destilasi vakum

Destilasi vakum merupakan teknik pemisahan cairan yang pada prinsipnya sama dengan Destilasi sederhana. Destilasi ini digunakan untuk cairan yang mendidih di atas 150°C pada tekanan 1 atm dari campuran, sedangkan cairan lainnya mendidih setidaknya 25°C lebih tinggi dari pada cairan yang pertama.

3. Destilasi fraksionasi

Destilasi fraksionasi disebut juga dengan Destilasi kolom (rektifikasi) karena pada metode ini menggunakan kolom dan kondensor. Pada Destilasi ini terjadi lintas arus fasa uap dan fasa cair kondensat dalam kolom.

4. Destilasi uap

Destilasi uap digunakan untuk mengisolasi minyak, dan senyawa lain yang larut, atau sedikit larut, dalam air pada semua suhu (Zubrick, 2001).

3.2. Peremajaan *Kombucha*

Sebelum digunakan sebagai starter maka dilakukan peremajaan terlebih dahulu dengan cara mendidihkan air sebanyak 1 liter, gula sebanyak 100 gram dicampur dengan baik dan dididihkan kembali selama 5 menit, teh dicampurkan pada larutan. Larutan dipindahkan dalam wadah kaca dan dinginkan. Setelah larutan teh dingin kemudian masukkan koloni *Kombucha* yang telah ada sebelumnya dan ditutup dengan kain kasa. Inkubasi selama 10 hari maka akan terbentuk lapisan baru dari koloni *Kombucha* yang dapat kita gunakan untuk penelitian selanjutnya (semakin lama inkubasi maka semakin tebal lapisan *Kombucha* yang kita dapat).