

Kesan Kepekatan Fukoidan dan Tempoh Penapaian terhadap Pencirian Fizikokimia Kombucha Diperkuat dengan Fukoidan

(The Effect of Fucooidan Concentrations and Fermentation Days on the Physicochemical Characterisation of Kombucha Fortified with Fucooidan)

NURUL IZZUANI MOHD ISA¹, NURUL NAJIHA AIN IBRAHIM¹, SITI NUR JELITA SABRAN¹, NOOR-SOFFALINA SOFIAN-SENG^{1,2}, LIM SENG JOE^{1,2}, HAFEEDZA ABDUL RAHMAN^{1,2}, WAN AIDA WAN MUSTAPHA^{1,2} & NOORUL SYUHADA MOHD RAZALI^{1,2*}

¹Jabatan Sains Makanan, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Pusat Inovasi Teknologi Manisan (MANIS), Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Diserahkan: 14 Mac 2022/Diterima: 4 Jun 2022

ABSTRAK

Kombucha adalah sejenis minuman yang terhasil daripada penapaian teh manis dengan menggunakan kultur simbiotik bakteria dan yis. Fukoidan merupakan sejenis polisakarida fungsian daripada rumpai laut yang dipercayai mempunyai kesan kesihatan yang baik. Penyelidikan ini telah dijalankan bertujuan untuk mengetahui kesan kepekatan fukoidan (0, 0.25, 0.5, 0.75 dan 1.00 mg/mL) dan hari penapaian yang berbeza terhadap sifat fizikokimia (pH, jumlah pepejal terlarut (TSS), warna, kandungan fenol jumlah (TPC), kandungan flavonoid jumlah (TFC), kandungan gula, kandungan alkohol dan keasidan boleh titrat (TA)) serta kualiti kimia kombucha yang diperkaya dengan fukoidan. Nilai pH sampel kombucha menurun dengan ketara ($p < 0.05$) apabila tempoh penapaian berpanjangan. Penambahan fukoidan mempengaruhi warna L^* , a^* , dan b^* tanpa corak tertentu. Tempoh penapaian yang lebih lama meningkatkan kecerahan, namun mengurangkan kemerahan dan kekuningan semua sampel kombucha. Sementara itu, kandungan TSS dan gula sampel kombucha berkadar songsang dengan tempoh penapaian, kecuali bagi kombucha (0.75 mg/mL) yang dicatatkan lebih tinggi ($p < 0.05$) nilai TSS daripada kombucha (0.25 mg/mL fukoidan) pada hari ke 14. Bagaimanapun, tiada kesan signifikan ($p > 0.05$) penambahan kombucha yang diperkuat dengan fukoidan terhadap gula. Secara keseluruhan, jumlah kandungan fenol dan flavonoid meningkat ($p < 0.05$) dengan penambahan fukoidan dan tempoh penapaian, manakala peratusan TA dan kandungan etanol kombucha meningkat dengan tempoh penapaian berpanjangan. Kesimpulannya, sampel kombucha mengalami perubahan fizikokimia dan peningkatan jumlah kandungan fenol dan flavonoid selari dengan tempoh penapaian. Kajian ini menunjukkan bahawa fukoidan berpotensi digunakan sebagai bahan berfungsi dalam minuman kombucha.

Kata kunci: Antioksidan; fukoidan; minuman kombucha; teh

ABSTRACT

Kombucha is a beverage produced by fermentation of sweet tea using symbiotic cultures of bacteria and yeast. Fucooidan is a functional polysaccharide from seaweeds which have been believed to have beneficial health effect. This study aimed to determine the effect of different fucooidan concentrations (0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1.00 mg/mL) and fermentation days on the physicochemical properties (pH, total soluble solids (TSS), colour, total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), sugar content, alcohol content and titratable acidity (TA)) of kombucha fortified with fucooidan. The pH value of kombucha samples decreased significantly ($p < 0.05$) when the fermentation period was prolonged. The addition of fucooidan affects the properties of L^* , a^* , and b^* of kombucha without a specific trend. In general, longer fermentation period increased brightness but decrease redness and yellowness of all kombucha samples. Meanwhile TSS and sugar content of kombucha samples were inversely proportional with the fermentation period, except for kombucha with 0.75 mg/mL fucooidan which recorded significantly higher ($p < 0.05$) TSS values

than kombucha with 0.25 mg/mL fucoidan on day 14. However, there was no significant ($p>0.05$) of sugar content of fortified kombucha with fucoidan. Overall, the total phenolic and flavonoid content increased significantly ($p<0.05$) with the addition of fucoidan and fermentation time, meanwhile the percentage of TA and ethanol content of kombucha increased with the prolonged fermentation period. In conclusion, kombucha samples undergo physicochemical changes with increased total phenolic and flavonoid content along with the fermentation period. This study shows that fucoidan has the potential to be applied as a functional ingredient in kombucha drinks.

Keywords: Antioxidant; fucoidan; kombucha beverage; tea

PENDAHULUAN

Kombucha merupakan minuman hasil daripada penapaian teh manis dengan kultur simbiotik bakteria dan yis atau dikenali sebagai SCOBY dan minuman ini mempunyai rasa yang sedikit manis, masam dan menyegarkan (Dutta & Paul 2019). Kombucha mempunyai dua lapisan yang berbeza iaitu lapisan pelikel selulosa yang terapung di permukaan kombucha dan larutan masam yang diminum oleh pengguna. Lapisan pelikel selulosa tersebut adalah kultur kombucha yang baharu dan komposisinya terdiri daripada beberapa spesies yis dan bakteria asid asetik, manakala larutan masam pula mengandungi komponen seperti asid asetik, polifenol dan vitamin (Jayabalan et al. 2014; Villareal-Soto et al. 2018). Justeru, teh kombucha yang mempunyai sifat probiotik dipercayai dapat memberi kesan terapeutik terhadap kesihatan pengguna seperti mengurangkan tekanan darah, memperbaiki kesihatan usus dan memberikan ketahanan terhadap penyakit barah (Villarreal-Soto et al. 2018).

Semasa proses penapaian kombucha, terdapat perubahan fizikokimia berlaku seperti nilai pH, warna, kandungan gula, kandungan asid organik dan juga kandungan etanol (Kallel et al. 2012; Muhiyudin et al. 2019; Nurikasari et al. 2017; Spasenija et al. 2012; Talebi et al. 2017). Komposisi kimia produk akhir kombucha bergantung kepada faktor penggunaan substrat iaitu jenis teh, sumber karbon (seperti jenis gula), serta kultur pemula kombucha, masa dan suhu penapaian (Nguyen et al. 2015; Villareal-Soto et al. 2018; Watawana et al. 2017). Kebiasaannya, masa penapaian kombucha adalah sekitar 7 hingga 10 hari pada suhu bilik bagi menjamin produk akhir kombucha berkualiti dan nilai pH kombucha terkawal serta sesuai untuk diminum oleh pengguna (Nurmer 2013).

Daun teh atau nama saintifiknya iaitu *Camellia sinensis* merupakan substrat yang penting dalam penghasilan minuman kombucha kerana teh berfungsi sebagai medium yang menyediakan sumber nitrogen

untuk pertumbuhan kultur kombucha dan juga merupakan sumber utama polifenol dalam produk akhir (Velicanski et al. 2013). Kebiasaannya, penghasilan kombucha adalah dengan menggunakan teh hitam sebagai substrat utama kerana teh hitam merupakan jenis teh yang majoriti diminum oleh pengguna, kaya dengan sebatian fungsian seperti polifenol (Gaggia et al. 2018) serta dilaporkan sebagai substrat terbaik untuk penghasilan kombucha (Laureys et al. 2020).

Dalam kajian ini, penghasilan teh kombucha yang diperkaya dengan fukoidan telah dilakukan untuk meningkatkan nilai minuman berfungsi teh. Fukoidan merupakan polisakarida sulfat yang berstruktur heterogen yang terdapat pada dinding sel beberapa jenis rumpai laut perang (Wang et al. 2019). Menurut Zhao et al. (2018), penambahan fukoidan dalam makanan, minuman serta ubat-ubatan untuk meningkatkan ciri berfungsi dan nilai pemakanan menjadi semakin meluas kerana fukoidan dilaporkan mempunyai pelbagai aktiviti biologi seperti anti-tumor, anti-kanser, anti-koagulan, anti-virus, anti-bakteria dan antioksidan. Oleh itu, kajian ini telah dijalankan untuk mengenal pasti perubahan sifat fizikokimia kombucha yang diperkaya dengan fukoidan pada kepekatan berbeza (0.00, 0.25, 0.50, 0.75 dan 1.0 mg/mL) selama 0, 7, dan 14 hari penapaian.

BAHAN DAN KAEDAH

Bahan mentah yang digunakan dalam kajian ini adalah teh hitam (BOH), sukrosa (CSR) yang dibeli dari Econsave, Bangi, Selangor, Malaysia, kultur pemula kombucha mengandungi kultur simbiotik bakteria dan yis atau SCOBY dibeli melalui aplikasi dalam talian *Shopee* dan fukoidan (SupaFuco) diperoleh daripada Cosway Malaysia. Manakala bahan kimia yang digunakan ialah reagen Folin-Ciocalteu, natrium karbonat (Na_2CO_3), asid galik, natrium nitrat (NaNO_3), aluminium klorida (AlCl_3), natrium hidroksida, kuersetin, fenol, asid sulfurik (H_2SO_4), glukosa, fenolphthalein, natrium hidroksida

(NaOH), natrium dikromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) dan penimbal asetat diperoleh daripada Merck, Jerman.

PENGHASILAN KULTUR TEH PEMULA

Kultur teh pemula dihasilkan dengan menggunakan kaedah Wang (2018) dengan sedikit pengubahsuaian. Teh hitam untuk penghasilan kultur teh pemula disediakan dengan merendam tiga uncang teh (3 g daun teh/uncang) ke dalam 1.5 L air suling bersuhu 100°C selama 30 minit. Larutan ini dikacau dan uncang teh ditekan setiap 5 minit. Uncang teh kemudiannya dikeluarkan sebelum 150 g gula dilarutkan semasa teh masih panas dengan nisbah air seduhan teh kepada gula 10:1 (v:w). Kemudian, larutan ini telah dibiarkan sejuk sehingga mencapai suhu bilik (27°C). Seterusnya, sebanyak 1.35 L larutan teh dituangkan ke dalam botol kaca 2 L yang telah disterilkan dan kemudian 150 mL larutan asal kombucha dari ibu kombucha yang mengandungi lapisan pelikel selulosa (SCOBY) telah dimasukkan ke dalam botol kaca tersebut. Jumlah isi padu akhir larutan adalah 1.5 L. Botol kaca ditutup dengan kain muslin dan ditapai selama 7 hari pada suhu bilik (27°C). Teh pemula ini digunakan sebagai ibu kombucha semasa penyediaan sampel yang seterusnya. Kesemua langkah di atas telah diulang sebanyak tiga kali untuk mendapatkan bacaan tiga replikasi.

PENGHASILAN SAMPEL KOMBUCHA

Lima sampel kombucha diperkaya dengan fukoidan

telah diformulasikan seperti dalam Jadual 1. Dalam kajian ini, reka bentuk faktor (5 x 3) telah digunakan iaitu kepekatan fukoidan yang berbeza (0, 0.25, 0.5, 0.75 dan 1.00 mg/mL) dan masa penapaian yang berbeza (0, 7 dan 14 hari). Larutan teh (Jadual 1) telah dihasilkan menggunakan prosedur sama seperti dalam penghasilan kultur teh pemula. Campuran teh hitam telah dibahagikan ke dalam lima balang kaca 250 mL dan setiap balang mengandungi 180 mL teh. Seterusnya, fukoidan pada kepekatan yang dinyatakan pada Jadual 1 telah ditambahkan ke dalam setiap formulasi dan dikacau menggunakan sudu sehingga sebati. Sampel yang tidak ditambah fukoidan merupakan sampel kawalan dalam kajian ini.

Sebanyak 20 mL larutan kultur pemula kombucha yang dihasilkan telah ditambah ke dalam setiap balang. Manakala, SCOBY yang bertindak selaku pemula proses penapaian (Rajah 1) telah dipotong menggunakan pisau kepada empat bahagian (1.25 cm/bahagian) dan dimasukkan ke dalam setiap balang kaca (250 mL). Jumlah isi padu akhir semua sampel adalah 200 mL dan sampel ditutup dengan kain muslin dan ditapai pada suhu bilik (27°C). Sampel yang terhasil pada hari penyediaan adalah sampel kombucha hari 0, diikuti oleh sampel yang ditapai sehingga hari 7 dan 14. Penghasilan sampel kombucha telah dihasilkan sebanyak tiga replikasi. Kesemua sampel kemudiannya telah dianalisis sifat fizikokimianya.

JADUAL 1. Formulasi sampel kombucha kajian

Formulasi	Isi padu larutan teh (mL)	Isi padu teh pemula (mL)	Lapisan pelikel selulosa (SCOBY) (cm)	Kepekatan fukoidan (mg/mL)
1	180	20	1.25	0
2	180	20	1.25	0.25
3	180	20	1.25	0.5
4	180	20	1.25	0.75
5	180	20	1.25	1.00



RAJAH 1. Lapisan pelikel selulosa (SCOBY)

ANALISIS FIZIKAL

Analisis fizikal yang dijalankan adalah pH, jumlah pepejal terlarut (TSS) dan warna. Analisis pH dilakukan menggunakan meter pH (Senz pH 0~14.0 pH, Trans Instruments, Singapura) (Gahruie et al. 2017) yang telah dikalibrasi. Bagi penentuan kepekatan jumlah pepejal terlarut (TSS) pula, ujian dijalankan pada suhu ambien (22 ke 28 °C) menggunakan alat refraktometer digital (Atago PR-101, Japan). Refraktometer digital dikalibrasi terlebih dahulu dengan air suling mengikut kaedah AOAC 932.12 (AOAC 1990). Keputusan telah dinyatakan sebagai °Briks (°Briks adalah unit TSS dan 1°Briks bersamaan dengan 1 g TSS dalam 100 g larutan). Manakala warna sampel kawalan dan kombucha yang diperkaya dengan fukoidan telah diukur dengan menggunakan Minolta CR-400 Kroma Meter (Konica Minolta Sensing, Inc., Japan) (Muhialdin et al. 2019). Meter kroma telah dikalibrasi pada sistem ruang warna CIE LAB menggunakan jubin putih (Dc: L = 97.79, a = -0.11, b = 2.69). Nilai ‘*L’ masing-masing mewakili kecerahan dan nilai ‘a*’ dan ‘b*’ mewakili warna kemerahan-kehijauan dan warna kekuningan.

KANDUNGAN FENOL JUMLAH (TPC)

Kandungan fenol jumlah (TPC) sampel kawalan dan kombucha yang diperkaya dengan fukoidan diukur menggunakan kaedah Folin-Ciocalteu seperti yang dijelaskan oleh Ho et al. (2020) dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 0.3 mL sampel dicampurkan dengan 1.5 mL reagen Folin-Ciocalteu dan 1.2 mL 7.5% w/v larutan natrium karbonat (Na₂CO₃). Kemudian, campuran dibiarkan bertindak balas pada suhu bilik (27 °C) selama 90 minit dalam keadaan yang gelap sebelum penyerapan diukur pada 765 nm dalam 96 mikroplat menggunakan spektrofotometer (BioTek Epoch).

Lengkuk piawai asid galik disediakan pada kepekatan 0.003 ke 0.5 mg/mL dan TPC dinyatakan sebagai miligram kesetaraan asid galik per mililiter sampel (mg GAE/mL). Bacaan bagi kandungan fenol telah dihitung dengan menggunakan formula berikut:

$$\text{TPC (mg GAE/mL)} = R \times \text{DF}$$

dengan R ialah bacaan dari lengkung piawai dan DF ialah faktor pencairan.

JUMLAH KANDUNGAN FLAVONOID (TFC)

Jumlah kandungan flavonoid sampel kawalan dan kombucha yang diperkaya dengan fukoidan diukur berdasarkan kaedah Habibi et al. (2015) dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 1.0 mL sampel telah dicampurkan dengan 4 mL air suling dan seterusnya dicampurkan dengan 0.3 mL 10% natrium nitrat (NaNO₃). Selepas 5 minit, 0.3 mL 10% aluminium klorida (AlCl₃) telah ditambah ke dalam campuran dan diikuti sekali dengan penambahan 2.0 mL 1% natrium hidroksida. Penyerapan campuran tindak balas telah diukur pada 510 nm menggunakan Mikroplat Spektrofotometer Epoch™, Instrumen Bioteknologi (USA). Kuersetin pada kepekatan 0.1 ke 0.6 mg/mL telah digunakan sebagai piawai dan nilai flavonoid telah dinyatakan sebagai miligram kesetaraan kuersetin per isi padu sampel kombucha. Bacaan bagi kandungan flavonoid telah dihitung dengan menggunakan formula berikut:

$$\text{TFC (mg/mL QUE)} = R \times \text{DF}$$

dengan R ialah bacaan dari lengkung piawai dan DF ialah faktor pencairan.

JUMLAH KANDUNGAN GULA

Jumlah kandungan gula ditentukan dengan menggunakan kaedah fenol-asid sulfurik (Ho et al. 2020) dengan sedikit pengubahsuaian. Sebanyak 2 mL sampel telah dicampurkan dengan 1 mL larutan fenol (5%) dalam tabung uji. Kemudian 5 mL asid sulfurik pekat (H_2SO_4) telah ditambahkan ke dalam tabung uji dan campuran telah divorteks selama 30 saat dan telah dibiarkan selama 10 min sebelum diletakkan ke dalam rendaman air yang bersuhu 25 °C selama 20 min. Penyerapan sampel telah diukur pada 490 nm dengan menggunakan Mikroplat Spektrofotometer (BioTek Epoch). Lengkuk piawai telah disediakan dengan menggunakan glukosa sebagai larutan piawai pada kepekatan 0.002 ke 0.025% dan jumlah kandungan gula telah dinyatakan sebagai peratusan kesetaraan glukosa (% GE) berdasarkan formula berikut:

$$\text{Jumlah kandungan gula (\% GE)} = R \times DF$$

dengan R ialah bacaan dari lengkung piawai dan DF ialah faktor pencairan.

KANDUNGAN ETANOL

Kandungan etanol dalam sampel kawalan dan kombucha yang diperkaya dengan fukoidan telah ditentukan dengan menggunakan kaedah Ho et al. (2020). Sebanyak 1 mL sampel telah dicampurkan dengan 5 mL 2.5% w/v larutan natrium dikromat ($Na_2Cr_2O_7$), 5 mL larutan penimbal asetat (0.1 mol/L, pH 4.3) dan 25 mL larutan 1 M asid sulfurik. Kemudian, campuran divorteks selama 1 minit dan dibiarkan selama 2 jam pada suhu 27 °C. Penyerapan diukur pada 578 nm dalam 96 mikroplat menggunakan spektrofotometer (BioTek Epoch) lengkung piawai disediakan menggunakan etanol pada kepekatan 5 ke 40%. Kandungan etanol ditentukan berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Kandungan etanol (\%)} = R \times DF$$

dengan R ialah bacaan dari lengkung piawai dan DF ialah faktor pencairan.

KEASIDAN BOLEH TITRAT (TA)

Keasidan boleh titrat (TA) ditentukan dengan pentitratan asid-bes menggunakan 1% fenolphthalein sebagai penunjuk mengikut kaedah AOAC (AOAC 947.05, 2005). Sebanyak 10 mL sampel kombucha telah dicampurkan dengan 20 mL air suling. Kemudian beberapa titis (4-5 titis) 1% larutan fenolphthalein telah

ditambah ke dalam campuran dan dipusar berterusan sehingga campuran sebatu. Seterusnya campuran telah dititrat dengan 0.1 M larutan natrium hidroksida (NaOH) terpiawai sehingga warna merah jambu berterusan selama 30 saat pertama dihasilkan dan isi padu larutan piawai yang digunakan telah direkodkan. Keasidan dihitung dan dinyatakan dalam gram asid asetik per liter sampel. Keasidan boleh titrat diukur sebanyak dua kali pengulangan.

$$\% \text{ Asid asetik} = (\text{isi padu NaOH yang digunakan (mL)} \times 0.0060) / (\text{isi padu sampel (mL)}) \times 100$$

dengan berat molekul asid asetik = 60 g/mol; 1 mL 0.1 M NaOH = 0.0060 g asid asetik; 1 mL sampel ujian \approx 1 g sampel.

ANALISIS STATISTIK

Analisis statistik telah dijalankan menggunakan Perisian Minitab versi 20.0. Kesemua analisis dilakukan sebanyak tiga replikasi (n=3). Ujian Analisis Varians (ANOVA) dua hala dan ujian Tukey digunakan bagi penentuan perbezaan antara sampel pada aras signifikan 95% (p<0.05).

HASIL DAN PERBINCANGAN

pH DAN JUMLAH PEPEJAL TERLARUT (TSS)

Nilai pH dan jumlah pepejal terlarut (TSS) kombucha diperkaya dengan fukoidan adalah seperti yang terdapat dalam Jadual 2. Penambahan fukoidan didapati meningkatkan nilai pH sampel kombucha manakala pemanjangan tempoh hari penapaian telah menyebabkan penurunan nilai pH semua sampel kombucha. Peningkatan pH kombucha yang signifikan (p<0.05) telah diperhatikan apabila ditambah dengan fukoidan iaitu pada kepekatan 0.50, 0.75 dan 1.00 mg/mL berbanding kawalan. Hal ini dapat dijelaskan dengan kehadiran kumpulan sulfat daripada fukoidan yang menjadikannya bercas negatif, lalu ia membantu memerangkap ion H^+ dalam sistem dan sekali gus meningkatkan pH kombucha. Namun, sepanjang tempoh penapaian, tiada perbezaan signifikan (p>0.05) pada pH telah direkodkan dalam kesemua sampel kombucha. Variasi dalam nilai pH berlaku kerana perbezaan medium kombucha iaitu penambahan fukoidan dan struktur fukoidan yang mempunyai kumpulan sulfat serta bercas negatif telah memberikan kesan terhadap substrat kombucha dan mempengaruhi metabolisme teh kombucha (Chu & Chen 2006).

JADUAL 2. Kesan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza terhadap nilai pH dan nilai pepejal larut kombucha yang diperkuat dengan fukoidan

Parameter	Kepekatan fukoidan (mg/mL)	Hari penapaian		
		0	7	14
pH	0.00	4.38 ± 0.03 ^b	3.28 ± 0.03 ^c	2.52 ± 0.03 ^h
	0.25	4.40 ± 0.05 ^b	3.40 ± 0.00 ^{dc}	2.60 ± 0.05 ^{gh}
	0.50	4.58 ± 0.03 ^a	3.42 ± 0.03 ^d	2.65 ± 0.00 ^g
	0.75	4.60 ± 0.05 ^a	3.50 ± 0.00 ^{cd}	2.88 ± 0.08 ^f
	1.00	4.67 ± 0.03 ^a	3.55 ± 0.09 ^c	3.00 ± 0.00 ^f
Jumlah pepejal terlarut (°Briks)	0.00	10.67 ± 0.14 ^a	9.92 ± 0.14 ^{bc}	9.17 ± 0.14 ^{dc}
	0.25	10.50 ± 0.00 ^a	9.83 ± 0.14 ^{bc}	9.00 ± 0.25 ^c
	0.50	10.83 ± 0.14 ^a	9.83 ± 0.14 ^{bc}	9.33 ± 0.14 ^{dc}
	0.75	10.67 ± 0.14 ^a	10.00 ± 0.00 ^b	9.50 ± 0.00 ^{cd}
	1.00	10.83 ± 0.14 ^a	9.92 ± 0.14 ^{bc}	9.08 ± 0.14 ^{dc}

Data dinyatakan dalam bacaan min ± sisihan piawai secara tiga replikasi. ^{a-h}Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) parameter pH dan jumlah pepejal larut pada kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza

Hasil kajian juga mendapati kepekatan fukoidan yang berbeza tidak menunjukkan sebarang perbezaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada jumlah TSS pada hari penapaian 0 dan 7. Namun bagi hari penapaian 14, kombucha (0.25 mg/mL fukoidan) mempunyai nilai TSS lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding kombucha (0.75 mg/mL fukoidan). Hal ini berikutan kepekatan akhir gula dalam setiap proses penapaian boleh berbeza-beza kerana terdapat pelbagai faktor yang mempengaruhi kesannya seperti penggunaan jenis substrat, jenis bahan mentah (infusi teh atau ekstrak tumbuhan) dan suhu penapaian (Chen & Liu 2000). Oleh itu, metabolisme dalam proses penapaian kombucha kebiasaannya tidak sama. Keputusan kajian juga menunjukkan nilai TSS sampel kawalan dan sampel kombucha yang berbeza kepekatan fukoidan mencatat penurunan signifikan ($p < 0.05$) daripada 10.50 ke 10.83 °Briks kepada 9.00 ke 9.50 °Briks apabila menjalani tempoh penapaian daripada hari penapaian 0 sehingga hari penapaian 14. Hasil kajian ini disokong oleh Wang (2018) yang melaporkan bahawa teh hijau kombucha yang mengandungi 10% gula menurun secara signifikan ($p < 0.05$) bermula hari penapaian 7 sehingga hari penapaian 14 dengan nilai TSS menurun daripada 10.50 ke 10.70 kepada 9.80 ke 10.25 °Briks. Hal ini disebabkan oleh semasa penapaian, mikroorganisma menukarkan

gula kepada etanol dan kemudian menjadi asid asetik serta pelbagai asid organik yang lain termasuklah asid sitrik dan asid glukonik (Jayabalan et al. 2014; Tamer et al. 2021). Hasil mekanisme ini menyebabkan jumlah pepejal terlarut (TSS) di dalam medium kombucha menurun sepanjang tempoh penapaian berlangsung.

WARNA

Parameter warna L^* (Jadual 3) dipengaruhi dengan kehadiran fukoidan dan hari penapaian. Secara umumnya, kombucha yang diperkuat dengan fukoidan pada kepekatan tinggi (0.75 dan 1.0 mg/mL) menyebabkan penurunan nilai L^* secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding sampel kawalan kombucha pada hari penapaian 0, 7 dan 14. Hal ini disebabkan terdapat pengaruh proses penapaian iaitu proses metabolisme yang dijalankan oleh yis dan bakteria di dalam medium kombucha (Chakravorty et al. 2016). Bagaimanapun, pemanjangan tempoh penapaian telah menyebabkan peningkatan nilai L^* pada semua sampel kombucha. Berdasarkan nilai L^* (Jadual 3), warna minuman kombucha yang diperkaya dengan fukoidan diperhatikan menjadi lebih cerah daripada 20.27 ke 21.55 (hari permulaan penapaian) kepada 23.43 ke 26.05 (hari ke-14). Perubahan warna kombucha yang diperhatikan mungkin disebabkan oleh

penindasan pengionan dan pemusnahan polifenol oleh aktiviti enzim kultur kombucha yang berlaku di dalam medium kombucha (Haslam 2003; Jayabalan et al. 2014).

JADUAL 3. Kesan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza terhadap warna kombucha yang diperkuat dengan fukoidan

Parameter	Kepekatan fukoidan (mg/mL)	Hari penapaian		
		0	7	14
Kecerahan (L*)	0.0	21.24 ± 0.56 ^{fg}	25.03 ± 0.36 ^{bc}	26.05 ± 0.10 ^a
	0.25	21.55 ± 0.29 ^f	23.12 ± 0.16 ^e	25.49 ± 0.53 ^{ab}
	0.50	21.10 ± 0.20 ^{fgh}	23.26 ± 0.09 ^e	24.30 ± 0.25 ^{cd}
	0.75	20.27 ± 0.25 ^h	23.58 ± 0.56 ^{de}	23.94 ± 0.14 ^{de}
	1.00	20.44 ± 0.16 ^{gh}	23.29 ± 0.02 ^e	23.43 ± 0.25 ^{de}
Kemerahan (a*)	0.0	5.39 ± 0.21 ^{bcd}	6.14 ± 0.19 ^{ab}	4.89 ± 0.40 ^{def}
	0.25	5.39 ± 0.27 ^{bcd}	5.92 ± 0.12 ^{abc}	4.50 ± 0.37 ^{efg}
	0.50	5.68 ± 0.53 ^{bcd}	5.55 ± 0.43 ^{bcd}	4.00 ± 0.12 ^{fgh}
	0.75	5.03 ± 0.24 ^{cde}	6.65 ± 0.52 ^a	3.60 ± 0.23 ^{gh}
	1.00	5.38 ± 0.32 ^{bcd}	5.87 ± 0.13 ^{abc}	3.19 ± 0.14 ^h
Kekuningan (b*)	0.0	11.70 ± 0.64 ^a	10.25 ± 0.50 ^{ab}	10.68 ± 0.64 ^{ab}
	0.25	10.94 ± 0.70 ^{ab}	10.39 ± 0.55 ^{ab}	9.20 ± 0.29 ^{bc}
	0.50	11.59 ± 0.40 ^a	8.17 ± 1.65 ^{cd}	8.17 ± 0.14 ^{cd}
	0.75	10.38 ± 0.17 ^{ab}	11.45 ± 0.38 ^a	7.39 ± 0.17 ^d
	1.00	10.79 ± 0.27 ^{ab}	10.06 ± 0.02 ^{ab}	7.04 ± 0.13 ^d

Data dinyatakan dalam bacaan min ± sisihan piawai secara tiga replikasi. ^{a-h}Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) parameter warna dengan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza

Secara umumnya, penambahan fukoidan pada kepekatan berbeza tidak memberi kesan signifikan terhadap parameter a* kecuali pada hari ke 14 untuk kombucha diperkuat dengan fukoidan pada kepekatan tinggi (0.75 dan 1.0 mg/mL) berbanding sampel kombucha kawalan. Pada hari penapaian 0, tiada perbezaan signifikan ($p > 0.05$) direkodkan bagi kesemua sampel kombucha. Namun, pada hari penapaian 7, sampel kombucha (0.75 mg/mL fukoidan) menunjukkan nilai a* lebih tinggi ($p < 0.05$) berbanding sampel kombucha (0.50 mg/mL fukoidan). Manakala bagi hari penapaian 14, nilai a* sampel kombucha (kawalan dan 0.25 mg/mL fukoidan) adalah lebih tinggi ($p < 0.05$) berbanding sampel kombucha (1.0 mg/mL fukoidan).

Kesan penurunan signifikan nilai a* (kombucha diperkuat dengan 0.75 dan 1.0 mg/mL fukoidan) pada hari ke 14 berkemungkinan berlaku disebabkan oleh transformasi dan degradasi sebatian polifenol apabila kombucha menjadi medium yang lebih berasid semasa penapaian berpanjangan (Chu & Chen 2006). Selain itu, bakteria dan yis seperti *Lactobacillus* sp. dan *Saccharomyces* sp. menghasilkan enzim tannase yang mampu mendegradasi tanin seterusnya menurunkan nilai L* dan a* (Nurhayati et al. 2020).

Manakala bagi nilai b*, tiada perbezaan signifikan ($p > 0.05$) diperhatikan bagi kesemua sampel kombucha pada hari penapaian 0. Namun bagi hari penapaian 7, sampel kombucha (0.50 mg/mL fukoidan) mencatat nilai

b* terendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding sampel lain. Seterusnya, pada hari penapaian ke-14, sampel kombucha (0.75 dan 1.0 mg/mL fukoidan) mencatat nilai b* lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding sampel kombucha (kawalan dan 0.25 mg/mL fukoidan). Hal ini kerana fukoidan mempunyai struktur gula yang terdiri daripada fukosa, xilosa dan galaktosa dan struktur gula ini boleh dijadikan sebagai bahan substrat untuk penapaian. Maka, nilai a* dan b* adalah bervariasi mengikut kepekatan fukoidan dan masa penapaian masing-masing. Di samping itu, penurunan pada nilai b* semasa penapaian juga adalah kesan daripada proses transformasi sebatian di dalam medium kombucha (Jayabalan et al. 2014). Perubahan warna berlaku mungkin disebabkan transformasi dan degradasi unsur di dalam teh di bawah persekitaran yang berasid semasa penapaian (Chu & Chen 2006). Tambahan pula, sepanjang tempoh penapaian, kandungan sebatian thearubigin (pigmen berwarna coklat perang) berkurangan, manakala kandungan sebatian theaflavin (pigmen berwarna kuning) pula meningkat (Chakravorty et al. 2016). Maka ia dapat menjelaskan perubahan warna kombucha yang menjadi lebih cerah apabila meningkat waktu penapaian (Chakravorty et al. 2016; Laureys et al. 2020).

KANDUNGAN FENOL JUMLAH (TPC) DAN KANDUNGAN FLAVONOID JUMLAH (TFC)

Polifenol dan flavonoid merupakan sebatian utama dalam ekstrak tumbuhan, termasuklah daun teh. Teh yang merupakan bahan utama minuman kombucha amat

kaya dengan sebatian polifenol seperti katekin, theaflavin dan tearubigin yang juga merupakan sebatian utama penyumbang kepada aktiviti antioksidan kombucha. Jadual 4 menunjukkan hasil kandungan fenol jumlah (TPC) dan kandungan flavonoid jumlah (TFC) bagi sampel kombucha. Nilai TPC tertinggi secara signifikan ($p < 0.05$) dikesan pada hari penapaian 14 dalam sampel kombucha (1.0 mg/mL fukoidan) berbanding kesemua sampel yang lain dengan nilai 0.51 ± 0.02 mg GAE/mL. Peningkatan TPC di dalam kombucha diperkaya dengan fukoidan seiring dengan tempoh penapaian berlangsung. Corak yang sama diperhatikan bagi keputusan TFC (Jadual 4) apabila sekali lagi sampel kombucha (1.0 mg/mL fukoidan) dikesan dengan nilai TFC tertinggi ($p < 0.05$) iaitu 2.10 ± 0.12 , 5.12 ± 0.06 dan 5.51 ± 0.08 mg QUE/mL mengatasi sampel yang lain masing-masing pada hari penapaian 0, 7 dan 14. Kehadiran sebatian polifenol yang kompleks dalam persekitaran berasid atau penghasilan pelbagai jenis enzim oleh yis dan bakteria menyebabkan pemecahan molekul kompleks kepada molekul lebih kecil dan sederhana, lalu menyebabkan peningkatan sebatian fenol dan flavonoid di dalam kombucha sepanjang proses penapaian berlangsung (Shahbazi et al. 2018; Srihari & Satyanarayana 2012). Selain itu, mikrob seperti *Candida tropicalis* yang terdapat di dalam medium kombucha dilaporkan mempunyai kemampuan untuk memecahkan pelbagai sebatian polifenol (Chakravorty et al. 2016; Ettayebi et al. 2003). Justeru, kehadiran sebatian fenol dan flavonoid bukan sahaja yang terbebas semasa proses penapaian berlaku, malah juga berkemungkinan daripada daun teh serta rumput laut perang (Hanjabam et al. 2019).

JADUAL 4. Kesan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza terhadap kandungan fenol jumlah (TPC) dan kandungan flavonoid jumlah (TFC) kombucha yang diperkuat dengan fukoidan

Parameter	Kepekatan fukoidan (mg/mL)	Hari penapaian		
		0	7	14
Kandungan fenol jumlah (TPC) (mg GAE/mL)	0.00	0.24 ± 0.01^b	0.25 ± 0.00^b	0.41 ± 0.01^{cd}
	0.25	0.29 ± 0.01^g	0.32 ± 0.00^{ef}	0.42 ± 0.01^c
	0.50	0.30 ± 0.01^{fg}	0.39 ± 0.01^d	0.43 ± 0.01^c
	0.75	0.31 ± 0.00^{efg}	0.41 ± 0.00^{cd}	0.48 ± 0.01^b
	1.00	0.34 ± 0.00^e	0.44 ± 0.00^c	0.51 ± 0.02^a
Kandungan flavonoid jumlah (TFC) (mg QUE/mL)	0.00	0.21 ± 0.02^j	0.38 ± 0.01^j	0.94 ± 0.04^{hi}
	0.25	0.83 ± 0.07^i	1.68 ± 0.14^g	3.71 ± 0.19^d
	0.50	1.12 ± 0.15^{hi}	2.55 ± 0.17^e	4.86 ± 0.17^{bc}
	0.75	1.21 ± 0.05^h	4.77 ± 0.04^c	4.74 ± 0.07^c
	1.00	2.10 ± 0.12^f	5.12 ± 0.06^b	5.51 ± 0.08^a

Data dinyatakan dalam bacaan min \pm sisihan piawai secara tiga replikasi. ^{a-j}Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan ($p < 0.05$) parameter TPC dan TFC dengan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza

JUMLAH KANDUNGAN GULA

Kandungan gula di dalam kombucha berubah mengikut masa dan keadaan penapaian. Seperti dalam Jadual 5, penambahan fukoidan pada kepekatan berbeza tidak memberi kesan signifikan ($p>0.05$) terhadap kandungan gula dalam sampel kombucha pada hari penapaian 0, 7 dan 14. Namun begitu, nilai jumlah kandungan gula (Jadual 5) bagi kesemua sampel kombucha (kawalan, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL dan 1.0 mg/mL) menunjukkan corak penurunan ($p<0.05$) dengan hari penapaian, bermula dari 10.01 % GE ke 10.61% GE (hari

penapaian 0), 8.40 % GE ke 9.22% GE (hari penapaian 7) dan seterusnya kepada 6.64% GE ke 6.90% GE (hari penapaian 14). Penurunan kandungan gula berlaku semasa penapaian kerana penukaran sukrosa kepada glukosa dan fruktosa yang seterusnya ditapaikan kepada etanol oleh yis. Kajian lepas oleh Neffe-Skocinska et al. (2017) telah mengesan berlakunya penurunan kandungan sukrosa sepanjang penapaian berlaku dalam produk kombucha iaitu dari 98.7 g/L ke 1.97 g/L pada hari penapaian 10, manakala bagi glukosa dan fruktosa ialah masing-masing 0.8 g/L ke 33.4 g/L dan 0.9 g/L ke 27.4 g/L.

JADUAL 5. Kesan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza terhadap jumlah kandungan gula, kandungan etanol dan keasidan boleh titrat kombucha yang diperkuat dengan fukoidan

Parameter	Kepekatan fukoidan (mg/mL)	Hari penapaian		
		0	7	14
Jumlah kandungan gula (%GE)	0.00	10.01 ± 0.18 ^{abc}	8.40 ± 0.16 ^d	6.84 ± 0.92 ^c
	0.25	10.08 ± 0.01 ^{abc}	8.45 ± 0.25 ^d	6.83 ± 0.42 ^c
	0.50	10.16 ± 0.02 ^{ab}	9.07 ± 0.09 ^{cd}	6.64 ± 0.38 ^c
	0.75	10.18 ± 0.05 ^{ab}	8.69 ± 0.07 ^d	6.86 ± 0.40 ^c
	1.00	10.61 ± 0.04 ^a	9.22 ± 0.19 ^{bcd}	6.90 ± 0.52 ^c
Kandungan etanol (%)	0.00	0.24 ± 0.02 ^{de}	0.26 ± 0.02 ^{cde}	0.48 ± 0.04 ^a
	0.25	0.21 ± 0.02 ^e	0.33 ± 0.05 ^{bc}	0.50 ± 0.05 ^a
	0.50	0.21 ± 0.02 ^e	0.31 ± 0.03 ^{bcd}	0.53 ± 0.05 ^a
	0.75	0.18 ± 0.02 ^e	0.27 ± 0.02 ^{bcd}	0.49 ± 0.05 ^a
	1.00	0.22 ± 0.02 ^{de}	0.35 ± 0.01 ^b	0.53 ± 0.01 ^a
Keasidan boleh titrat (%)	0.00	0.25 ± 0.03 ^e	0.58 ± 0.03 ^d	1.57 ± 0.01 ^a
	0.25	0.23 ± 0.01 ^e	0.55 ± 0.03 ^d	1.34 ± 0.07 ^b
	0.50	0.21 ± 0.01 ^e	0.52 ± 0.01 ^d	1.42 ± 0.02 ^b
	0.75	0.22 ± 0.01 ^e	0.49 ± 0.03 ^d	1.54 ± 0.05 ^a
	1.00	0.23 ± 0.02 ^e	0.50 ± 0.03 ^d	1.18 ± 0.07 ^c

Data dinyatakan dalam bacaan min ± sisihan piawai secara tiga replikasi. ^{a-c}Abjad yang berbeza menunjukkan perbezaan signifikan ($p<0.05$) parameter jumlah kandungan gula, kandungan etanol dan keasidan boleh titrat dengan kepekatan fukoidan dan hari penapaian yang berbeza

KANDUNGAN ETANOL

Sebaliknya peningkatan jumlah kandungan etanol dalam sampel kombucha telah direkodkan sepanjang tempoh penapaian (Jadual 5) dijalankan dengan nilai tertinggi iaitu $0.53 \pm 0.01\%$ pada hari penapaian 14. Tiada perbezaan signifikan ($p > 0.05$) bagi kesemua sampel kombucha pada hari penapaian 0 dan 14, namun bagi hari penapaian ke-7, sampel kombucha (1.0 mg/mL fukoidan) mencatat jumlah kandungan etanol yang lebih tinggi secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding sampel kawalan. Penambahan fukoidan yang merupakan polisakarida sulfat (dengan komponen monosakarida yang terdiri daripada manosa, galaktosa, glukosa, ramnosa dan xilosa) berpotensi menjadi sumber karbon untuk penapaian mikroorganisma SCOBY (Citkowska et al. 2019; Wang et al. 2019). Yis akan menggunakan sumber karbon tersebut untuk menghasilkan alkohol dan karbon dioksida melalui proses glikolisis mengakibatkan peningkatan jumlah etanol semasa proses penapaian (Kim & Adhikari 2020).

KEASIDAN BOLEH TITRAT (TA)

Berdasarkan Jadual 5, peratusan keasidan boleh titrat pada hari penapaian 0 bermula antara julat 0.21 ke 0.25%, kemudian meningkat pada hari penapaian 7 dan 14 masing-masing dengan nilai 0.49 ke 0.58% dan 1.18 ke 1.57%. Hasil kajian ini menunjukkan bahawa kepekatan fukoidan yang berbeza tidak memberikan perbezaan signifikan ($p > 0.05$) terhadap TA kombucha pada hari penapaian 0 dan 7 (Jadual 5). Namun pada hari penapaian 14, sampel kombucha (kawalan dan 0.75 mg/mL fukoidan) menunjukkan peratusan TA lebih tinggi ($p < 0.05$) berbanding sampel yang lain. Menurut Alderson et al. (2021), sampel yang mengandungi peratusan TA yang tinggi mempunyai keadaan pertumbuhan bakteria yang lebih baik untuk menghasilkan asid. TA sampel kombucha meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) dengan peningkatan hari penapaian (0, 7, dan 14) untuk sampel kawalan kombucha dan kombucha yang ditambah dengan fukoidan. Hasil kajian ini juga adalah selari dengan kajian oleh Chen dan Liu (2000) dan Loncar et al. (2006) yang mendapati bahawa peningkatan TA di dalam teh hitam kombucha seiring dengan tempoh hari penapaian dijalankan. Menurut Chakravorty et al. (2016), perubahan TA berlaku semasa proses penapaian adalah disebabkan terdapatnya penghasilan asid organik di dalam medium tersebut. Malah melalui ujian HPLC, pelbagai jenis asid organik telah dikesan di dalam kombucha termasuklah asid asetik, asid glukonik, asid sitrik dan asid laktik (Shahbazi et al. 2018). Keadaan

medium kombucha yang mempunyai pH rendah dan TA yang tinggi membantu pertumbuhan mikroorganisma misalnya bakteria asid asetik seperti *Komagataeibacter*, *Acetobacter* dan *Gluconobacter*, serta memberikan perlindungan daripada pencemaran invasif lalu menjadikan kombucha sebagai minuman yang selamat (Hur et al. 2014).

KESIMPULAN

Penambahan fukoidan dan hari penapaian menunjukkan perubahan fizikokimia terhadap minuman kombucha. Selepas penapaian selama 14 hari, kombucha yang diperkuat dengan fukoidan mempunyai nilai pH tidak kurang daripada 2.5 dan kandungan etanol tidak melebihi 1% menandakan selamat untuk diminum. Kandungan fenol jumlah dan kandungan flavonoid jumlah juga meningkat seiring masa penapaian dengan nilai tertinggi direkodkan dalam kombucha yang ditambah dengan 1.0 mg/mL fukoidan. Kesimpulannya, penggunaan fukoidan sebagai ingredien berfungsi dan masa penapaian dalam pembuatan teh kombucha berjaya meningkatkan kandungan sebatian fenol dan flavonoid kombucha, serta berhasil dalam mengawal nilai pH dan peratusan etanol minuman kombucha pada tahap yang selamat untuk pengguna. Maka, kajian terhadap potensi bioaktiviti dan penilaian sensori adalah wajar dijalankan bagi memperoleh maklumat yang lebih jelas mengenai tahap penerimaan pengguna terhadap kombucha diperkuat dengan fukoidan.

PENGHARGAAN

Kajian ini telah dijalankan dengan menggunakan dana penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia iaitu Geran Universiti Penyelidikan (GUP 2018 114). Setinggi-tinggi penghargaan juga ditujukan kepada pegawai makmal di Makmal Loji Pandu dan Makmal Pusat Inovasi Teknologi Manisan (MANIS), Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, kerana telah menyediakan kemudahan untuk analisis kajian dijalankan.

RUJUKAN

- Alderson, H., Liu, C., Mehta, A., Gala, H.S., Mazive, N.R., Chen, Y. & Serventi, L. 2021. Sensory profile of kombucha brewed with New Zealand ingredients by focus group and word clouds. *Fermentation* 7(3): 100.
- AOAC. 2005. AOAC Official Method 947.05. *Acidity of Milk, Titrimetric Method*. American Organization of Analytical Chemist International.

- AOAC. 1990. AOAC Official Method 932.12. *Solids (Soluble) in Fruits and Fruit Products*. American Organization of Analytical Chemist International.
- Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D. & Gachhui, R. 2016. Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. *International Journal of Food Microbiology* 220: 63-72.
- Chen, C. & Liu, B.Y. 2000. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 89(5): 834-839.
- Chu, S.C. & Chen, C. 2006. Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. *Food Chemistry* 98(3): 502-507.
- Citkowska, A., Szekalska, M. & Winnicka, K. 2019. possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms. *Marine Drugs* 17(8): 458.
- Dutta, H. & Paul, S.K. 2019. *Kombucha drink: production, quality, and safety aspects. Production and Management of Beverages, Vol. 1. The Science of Beverages*, disunting oleh Grumezescu, A.M. & Holban, A.M. Woodhead Publishing. hlm. 259-288.
- Ettayebi, K., Errachidi, F., Jamai, L., Tahri-Jouti, M.A., Sendide, K. & Ettayebi, M. 2003. Biodegradation of polyphenols with immobilized *Candida tropicalis* under metabolic induction. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 223(2): 215-219.
- Gahrue, H.H., Hosseini, S.M.H., Taghavifard, M.H., Eskandari, M.H., Golmakani, M.T. & Shad, E. 2017. Lipid oxidation, color changes, and microbiological quality of frozen beef burgers incorporated with Shirazi thyme, cinnamon, and rosemary extracts. *Journal of Food Quality* 2017: 6350156.
- Gaggia, F., Baffoni, L., Galiano, M., Nielsen, D.S., Jakobsen, R.R., Castro-Mejía, J.L., Bosi, S., Truzzi, F., Musumeci, F., Dinelli, G. & Di Gioia, D. 2018. Kombucha beverage from green, black and rooibos teas: A comparative study looking at microbiology, chemistry and antioxidant activity. *Nutrients* 11(1): 1.
- Habibi, M., Golmakani, M.T., Mesbahi, G., Majzoobi, M. & Farahnaky, A. 2015. Ultrasound- accelerated debittering of olive fruits. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 31: 105-115.
- Hanjabam, M.D., Kumar, A., Tejpal, C.S., Krishnamoorthy, E., Kishore, P. & Kumar, K.A. 2019. Isolation of crude fucoidan from *Sargassum wightii* using conventional and ultrasonication extraction methods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 20: 100-200.
- Haslam, E. 2003. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry* 64(1): 61-73.
- Ho, C.W., Lazim, A., Fazry, S., Hussain Zaki, U.K.H., Massa, S. & Lim, S.J. 2020. Alcoholic fermentation of soursop (*Annona muricata*) juice via an alternative fermentation technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100(3): 1012-1021.
- Hur, S.J., Lee, S.Y., Kim, Y.C., Choi, I. & Kim, G.B. 2014. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. *Food Chemistry* 160: 346-356.
- Jayabalan, R., Malbasa, R.V., Loncar, E.S., Vitas, J.S. & Sathishkumar, M. 2014. A review on kombucha tea microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(4): 538-550.
- Kallel, L., Desseaux, V., Hamdi, M., Stocker, P. & Ajandouz, E.H. 2012. Insights into the fermentation biochemistry of Kombucha teas and potential impacts of Kombucha drinking on starch digestion. *Food Research International* 49(1): 226-232.
- Kim, J. & Adhikari, K. 2020. Current trends in kombucha: Marketing perspectives and the need for improved sensory research. *Beverages* 6(1): 15.
- Laureys, D., Britton, S.J. & De Clippeleer, J. 2020. Kombucha tea fermentation: A review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 78(3): 165-174.
- Lončar, E., Djurić, M., Malbaša, R., Kolarov, L.J. & Klačnja, M. 2006. Influence of working conditions upon kombucha conducted fermentation of black tea. *Food and Bioprocess Technology* 84(3): 186-192.
- Muhialdin, B.J., Osman, F.A., Muhamad, R., Che Wan Sapawi, C.W.N.S., Anzian, A., Voon, W.W.Y. & Hussin, A.S. 2019. Effects of sugar sources and fermentation time on the properties of tea fungus (kombucha) beverage. *International Food Research Journal* 26(2): 481-487.
- Neffe-Skocinska, K., Sionek, B., Ścibisz, I. & Kołożyn-Krajewska, D. 2017. Acid contents and the effect of fermentation condition of kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties. *CyTA-Journal of Food* 15(4): 601-607.
- Nurhayati, N., Yuwanti, S. & Urbahillah, A. 2020. Karakteristik fisikokimia dan sensori *Kombucha cascara* (kulit kopi ranum). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 31(1): 38-49.
- Nguyen, N.K., Nguyen, P.B., Nguyen, H.T. & Le, P.H. 2015. Screening the optimal ratio of symbiosis between isolated yeast and acetic acid bacteria strain from traditional kombucha for high-level production of glucuronic acid. *LWT-Food Science and Technology* 64(2): 1149-1155.
- Nummer, B.A. 2013. Kombucha brewing under the food and drug administration model Food Code: Risk analysis and processing guidance (Special Report). *Journal of Environment Health* 76: 8-11.
- Nurikasari, M., Puspitasari, Y. & Siwi, R.P.Y. 2017. Characterization and analysis kombucha tea antioxidant activity based on long fermentation as a beverage functional. *Journal of Global Research in Public Health* 2(2): 90-96.
- Shahbazi, H., Hashemi, G.H., Golmakani, M.T., Eskandari, M.H. & Movahedi, M. 2018. Effect of medicinal plant type and concentration on physicochemical, antioxidant, antimicrobial, and sensorial properties of kombucha. *Food Science & Nutrition* 6(8): 2568-2577.
- Spasenija, M., Katarina, K., Vladimir, V., Dajana, H., Mirela, I., Marjan, R. & Maja, M. 2012. Physicochemical and textural properties of kombucha fermented dairy products. *African Journal of Biotechnology* 11(9): 2320-2327.

- Srihari, T. & Satyanarayana, U. 2012. Changes in free radical scavenging activity of kombucha during fermentation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4(11): 1978.
- Talebi, M., Frink, L.A., Patil, R.A. & Armstrong, D.W. 2017. Examination of the varied and changing ethanol content of commercial kombucha products. *Food Analytical Methods* 10(12): 4062-4067.
- Tamer, C.E., Temel, Ş.G., Suna, S., Karabacak, A.Ö., Özcan, T., Ersan, L.Y. & Çopur, Ö.U. 2021. Evaluation of bioaccessibility and functional properties of kombucha beverages fortified with different medicinal plant extracts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 45(1): 13-32.
- Velićanski, A.S., Cvetković, D.D. & Markov, S.L. 2013. Characteristics of kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family. *Romanian Biotechnological Letters* 18(1): 8034-8042.
- Villarreal-Soto, S.A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J.P. & Taillandier, P. 2018. Understanding kombucha tea fermentation: A review. *Journal of Food Science* 83(3): 580-588.
- Wang, X. 2018. Development and characteristics of green tea kombucha: A thesis presented in partial fulfilment of the requirements for The Degree of Master of Food Technology at Massey University, Albany, New Zealand. Doctoral dissertation, Massey University (Unpublished).
- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H. & Song, S. 2019. Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Marine Drugs* 17(3): 183.
- Watawana, M.I., Jayawardena, N., Ranasinghe, S.J. & Waisundara, V.Y. 2017. Evaluation of the effect of different sweetening agents on the polyphenol contents and antioxidant and starch hydrolase inhibitory properties of kombucha. *Journal of Food Processing and Preservation* 41(1): e12752.
- Zhao, Y., Zheng, Y., Wang, J., Ma, S., Yu, Y., White, W.L. & Lu, J. 2018. Fucoidan extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for nutraceuticals/functional foods. *Marine Drugs* 16(9): 321.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: syuhada_ns@ukm.edu.my