# BAB II
# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1. Kefir

Kefir adalah produk probiotik asam dan rendah alkohol yang terbuat dari biji kefir, yang merupakan konsorsium eksopolisakarida dan banyak mikroorganisme (Gut dkk., 2019). Berbeda dari produk fermentasi lainnya, kefir diperoleh melalui proses fermentasi susu pasteurisasi menggunakan *starter* berupa biji kefir (*kefir grain*/ *kefir granule*). Biji kefir berasal dari Pegunungan Kaukasus di Asia Tengah sekitar 1.000 tahun yang lalu yang terdiri dari berbagai macam ragi dan bakteri yang kompleks yang ditempatkan dalam matriks polisakarida (Nielsen dkk., 2014). Bakteri yang sering berhubungan dengan kefir termasuk bakteri asam laktat dan bakteri asam asetat (Garofalo dkk., 2015; Gethins dkk., 2016). Kualitas dan rasa produk kefir yang dihasilkan tergantung pada hubungan simbiosis antara bakteri asam laktat, ragi dan bakteri asam asetat (Atalar dkk., 2019).

Kefir dan yogurt keduanya memiliki perbedaan pada jenis kultur bakteri yang digunakan untuk fermentasi. Yogurt mengandung bakteri transisi yang dapat mempertahankan kebersihan sistem pencernaan dan menyediakan makanan untuk bakteri baik. Sedangkan kefir dapat benar-benar membersihkan saluran usus, sesuatu yang tidak dapat dilakukan pada yoghurt (Rahmah, 2016). Kefir juga dapat dibuat dari bahan baku sari atau ekstrak buah-buahan, dimana kefir jenis tersebut biasa disebut dengan *fruit kefir* atau *water kefir*. *Water kefir* adalah minuman air-sukrosa yang difermentasi untuk menghasilkan karbon dioksida dan etanol dengan konsentrasi rendah. *Water kefir* difermentasi melalui kombinasi bakteri dan ragi, yang hidup bersimbiosis dalam *water kefir grains*. Juga dikenal sebagai Tibicos atau kefir bergula, *water kefir* berbeda dari kefir berbahan dasar susu yang lebih populer karena butirannya terutama terdiri dari dekstran dan tembus pandang serta tampak seperti kristal (Marsh dkk., 2013).

Kefir yang dibuat dengan bahan dasar susu hewani memiliki kandungan lemak yang relatif lebih tinggi dan bagi beberapa orang dapat menimbulkan *intolerance* tertentu akibat adanya kandungan laktosa. Oleh karena itu, pengolahan *water kefir* dapat menjadi solusi yang tepat dalam mengatasi masalah tersebut

(Ningsih dkk., 2019). Bibit water kefir memiliki butir yang sedikit lebih transparan dan fermentasinya menggunakan media yang relatif lebih sederhana yaitu air yang ditambahkan gula. Manfaat dari *water kefir* diantaranya adalah adanya bakteri probiotik yang terbukti dapat memperbaiki proses pencernaan dengan menyediakan mikroflora yang dibutuhkan dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen di dalam saluran pencernaan (Muizuddin dan Zubaidah, 2015)

Bibit kefir atau *kefir grains* mengandung mikroba yang terdiri dari bakteri dan khamir yang memiliki peran masing-masing dalam pembentukan struktur dan cita rasa kefir. Bakteri berperan menghasilkan asam laktat dan komponen flavor, sedangkan khamir menghasilkan gas karbon dioksida ($CO_2$) dan sedikit alkohol saat proses fermentasi (Ningsih, 2014). Itulah sebabnya rasa kefir asam dan juga ada sedikit rasa alkohol dan soda, dan kombinasi karbon dioksida dan alkohol menghasilkan buih yang menciptakan karakter mendesis pada produk. Menurut Codex Alimentarius (Codex Stan 243-2003), kefir khas (susu fermentasi yang diperoleh dari biji-bijian kefir) harus mengandung setidaknya 2-7% protein, 0-6% asam laktat, dan kurang dari 10% lemak. Dan menurut Hidayati (2018), kefir mengandung alkohol sebanyak 0,5–1,0% dan komposisi kimiawi kefir tergantung pada bahan atau susu yang digunakan sebagai bahan bakunya. Kandungan gizi kefir per 100 gram dapat dilihat pada Tabel 2.1 di bawah ini:

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Kefir 100 gram

| Zat Gizi | Jumlah | Satuan |
|---|---|---|
| Energi | 160 | kkal |
| Karbohidrat | 8 | g |
| Protein | 14 | g |
| Lemak | 3 | g |
| Natrium | 90 | mg |
| Kalsium | 300 | mg |
| Vitamin A | 500 | IU |
| Vitamin B | 1000 | IU |

*Sumber : Sawitri, 2011*

Manfaat kefir dalam peningkatkan kesehatan antara lain yaitu perbaikan sistem kekebalan tubuh, aktivitas antimikroba, sistem pencernaan yang lebih baik, aktivitas antioksidan yang tinggi, antikarsinogenik dan antimutagenik, antiinflamasi, hipokolesterolemik, antihipertensi, efek antidiabetes, meningkatkan pencernaan laktosa secara cepat dan mengurangi gejala intoleransi laktosa, serta memiliki potensi sebagai alternatif pengobatan osteoporosis (Kesenka dkk., 2017). Nutrisi dasar kefir mirip dengan susu yang dihasilkan sehingga memiliki nilai gizi yang tinggi sebagai sumber protein dan kalsium. Selain itu, proses fermentasi selama produksi kefir dapat meningkatkan nilai gizi kefir dengan cara meningkatkan kuantitas, ketersediaan, daya cerna, dan daya asimilabilitas unsur hara (Zamzami, 2019).

Kefir sebagai minuman yang bergizi tinggi dengan kandungan gula susu (laktosa) yang relatif rendah dibandingkan susu murni, kefir sangat bermanfaat bagi penderita *lactose intolerant* atau tidak tahan terhadap laktosa, karena laktosanya telah dicerna menjadi glukosa dan galaktosa oleh bantuan enzim laktase yang berasal dari mikroba dalam butiran kefir. Kefir juga dapat menyembuhkan beberapa penyakit metabolism seperti diabetes, asma, arteriosclerosis, dan jenis tumor tertentu (Irfatun, 2015).

## 2.2. *Kefir Grains*

Perbedaan utama antara kefir dan produk susu fermentasi lainnya adalah penggunaan kultur *starter* yang disebut "biji kefir" untuk memfermentasi susu. Biji kefir tradisional diperoleh dari pembekuan berkala susu sapi dengan abomasum domba (perut keempat) dalam kantong kulit kambing. Setelah beberapa minggu, lapisan yang tidak larut dalam air, terbentuk di permukaan bagian dalam kantong tempat terjadinya koagulasi. Kemudian lapisan ini dibagi menjadi potongan-potongan kecil dan dikeringkan untuk mendapatkan butiran kefir (Kesenkas dkk., 2017). Ukuran butir kefir berkisar dari 2 sampai 20 mm atau lebih dan menyerupai kuntum kembang kol kecil dalam bentuk dan warna seperti pada Gambar 2.1.

*Sumber : Irfatun, 2015*

Gambar 2.1 Bibit Kefir

Massa biologis elastis atau agar-agar ini terdiri dari protein, lipid, dan polisakarida kapsul yang larut dalam air yang disebut kefiran. Beberapa spesies *Lactobacillus homofermentatif,* terutama *Lactobacillus kefiranofaciens,* menghasilkan kompleks kefiran yang mengelilingi ragi dan bakteri dalam butir kefir. Kefiran mengandung d-glukosa dan d-galaktosa dengan perbandingan 1: 1 dan merupakan sekitar 25% dari berat gabah kering (Pogacic dkk., 2013). Biji-bijian mengandung 85-90% air dan massa kering dari biji-bijian segar terdiri dari sekitar 57% karbohidrat, 33% protein, 4% lemak, dan 6% abu (Kesenkas dkk., 2017). Biji kefir yang diinokulasikan ke dalam susu akan mengembang (diameternya membesar) dan warnanya menjadi kecoklatan karena diselubungi oleh partikel-partikel susu.

Komposisi mikroba dalam bibit kefir terdiri dari *Acetobacter pasteurianus, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus kefiri, Lactobacillus kefiranofaciens, Pichia fermentans, Saccharomyces cerevisiae, Kazachstania unispora,* dan *Kluyveromyces marxianus* (Bourrie dkk., 2020). Bakteri asam laktat dan khamir yang terdapat dalam *kefir grains* meliputi *Lactobacillus lactic* dan *Lactobacillus kefirgranum* yang keduanya berperan dalam pembentukan asam laktat, *Lactobacillus kefiranofaciens* yang merupakan bakteri penyebab penggumpalan atau koagulasi, *Leuconostoc* merupakan pembentuk diasetil, dan *Candida* berperan dalam pembentukan etanol dan CO2 (Anarawati, 2020).

Di dalam Standar Codex No. 243 (Codex, 2003) dinyatakan bahwa *kefir grains* mengandung *Lactobacillus kefiri*, spesies dari genus *Leuconostoc*, *Lactococcus* dan *Acetobacter* yang tumbuh dengan hubungan yang kuat dan spesifik. Selain mengandung bakteri tersebut, *kefir grains* juga mengandung khamir yang berperan memfermentasi laktosa yaitu *Kluyveromyces marxianus* maupun khamir yang tidak dapat memfermentasi laktosa seperti *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Saccharomyces exiguus*. Koloni bakteri yang terdapat di dalam *kefir grains* dapat memproduksi beberapa vitamin yang sangat diperlukan tubuh, seperti asam folat, asam pantotenat, asam nikotinat, biotin, vitamin B6 dan B12, serta memiliki kemampuan dalam menurunkan kadar lemak dalam produk susu fermentasi (Anarawati, 2020).

## 2.3. *Water Kefir*

*Water kefir* adalah minuman probiotik yang dibuat melalui proses fermentasi selama satu hari atau lebih pada suhu ruang dengan menambahkan starter kristal alga, air, gula, serta buah-buahan kering seperti kismis dan potongan lemon (Sari, 2020). Dalam proses tradisional pembuatan kefir, biji kefir dimasukkan ke dalam larutan yang mengandung sukrosa 8%, buah-buahan kering (biasanya buah ara) dan beberapa irisan lemon. Fermentasi selama satu atau dua hari pada suhu kamar menghasilkan minuman berwarna keruh, berkarbonasi dan berwarna jerami, yang bersifat asam, miskin gula dan sedikit alkohol (Gulitz dkk., 2011). Larutan sukrosa yang difermentasi selama 2-4 hari pada suhu kamar dalam kondisi anaerobik, diikuti dengan pengayakan untuk memisahkan biji-bijian, yang digunakan kembali untuk proses fermentasi berikutnya melalui prosedur *backslopping*, dari cairan. Minuman fermentasi ini sedikit manis, asam, beralkohol dan berkilau, dengan warna kekuningan dan rasa buah dan aroma (Laureys dan De Vuyst, 2016).

Perkembangan terbaru adalah menggunakan kultur kefir untuk fermentasi substrat lain seperti jus buah. Ada 2 macam jenis fermentasi kefir, yaitu kefir susu (Rahman dkk., 1992) dan kefir air/*water kefir* (Gulitz dkk., 2011). Kefir susu dibuat dari bahan baku berupa susu sapi, susu kambing atau domba yang ditambahkan dengan *starter* kefir berupa granula/biji kefir (Farnworth, 2008), sedangkan untuk *water kefir* menggunakan bahan baku dari campuran biji kefir dengan air, buah-

buahan kering seperti kismis, potongan kecil dari lemon, dan gula pasir (Gulitz dkk., 2011). *Water kefir* menjadi salah satu alternative bagi seseorang yang memiliki tubuh intoleran terhadap kefir jenis susu baik susu sapi maupun susu kambing, karena water kefir dibuat dari campuran buah-buahan. *Water kefir* memiliki rasa sedikit asam (ringan) sehingga menjadikan prospek *water kefir* sebagai minuman kesehatan lebih banyak disukai oleh masyarakat dibandingkan *milk kefir* yang memiliki rasa asam lebih kuat (Sampurno, 2015).

Dalam memproduksi kefir sebagai minuman fermentasi, diperlukan syarat mutu sebagai acuan hasil akhir produk yang baik. Syarat mutu di Indonesia mengacu pada dokumen Standarisasi Nasional Indonesia yang dipublikasikan oleh Badan Standarisasi Nasional. Saat ini, kefir sebagai minuman fermentasi secara khusus belum ada, sehingga kefir sebagai minuman fermentasi akan mengacu pada syarat mutu produk sejenis yaitu minuman fermentasi berperisa yang dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Syarat Mutu Minuman Susu Fermentasi Menurut SNI 7552:2009

| No. | Kriteria Uji | Persyaratan | Satuan |
|---|---|---|---|
| 1. | Keadaan | | |
| | 1.1 Penampakan | cair | - |
| | 1.2 Bau | normal/khas | - |
| | 1.3 Rasa | asam/khas | - |
| | 1.4 Homogenitas | homogen | - |
| 2. | Lemak (b/b) | min. 0,6 maks. 0,5 | % |
| 3. | Protein (Nx6,38) (b/b) | min. 1,0 | % |
| 4. | Keasaman tertitrasi (dihitung sebagai asam laktat) (b/b) | 0,2 – 0,9 | % |
| 5. | Cemaran mikroba: | | |
| | 9.1 Salmonella sp / 25 ml | negatif | - |
| | 9.2 Listeria monocytogenes / 25 ml | negatif | - |
| 6. | Kultur *starter* | min. 1 x $10^6$ | Koloni/ml |

*Sumber : Badan Standarisasi Nasional, 2009*

## 2.4. Pembuatan Kefir Sari Kacang Hijau

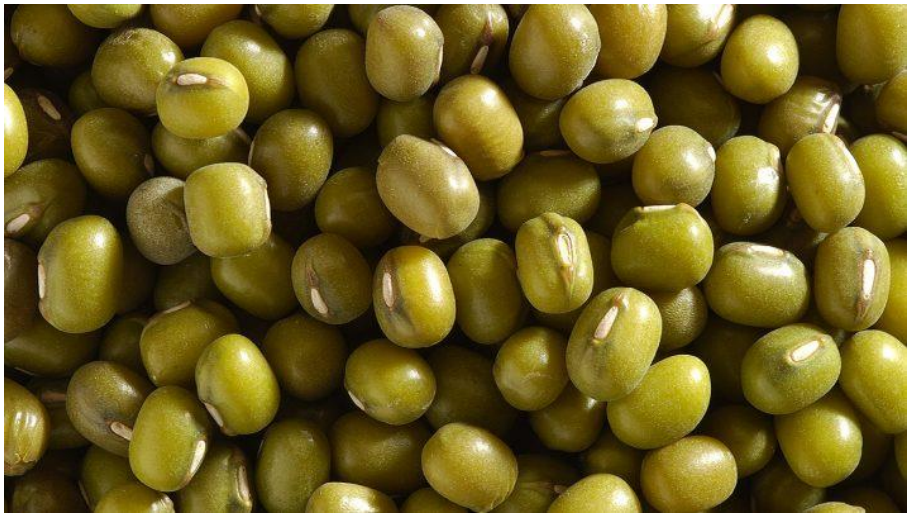
### 2.4.1. Kacang Hijau (*Vigna radiata*)

Kacang hijau merupakan salah satu jenis tumbuhan suku polong-polongan yang memiliki manfaat sebagai sumber vitamin (A, B1 dan C), mineral,

mengandung gizi seimbang, antara lain protein, serat pangan dan senyawa bioaktif dalam jumlah yang signifikan (Nasution dkk, 2020). Kacang hijau termasuk tanaman jenis *Leguminoceae* yang tahan akan kekeringan dan merupakan salah satu komoditas kacang-kacangan yang banyak dimakan rakyat Indonesia. Secara agronomis dan ekonomis, tanaman kacang hijau memiliki kelebihan dibanding tanaman kacang-kacangan lainnya (Febrianto dan Suliasih, 2018).

Klasifikasi tanaman kacang hijau dalam taksonomi tumbuhan adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta*
Subdivisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dicotyldonae*
Ordo : *Leguminales*
Familia : *Leguminosae*
Genus : *Vigna*
Spesies : *Vigna radiata* L. (Purwono dan Hartono, 2012)



*Sumber : PT Total Harvest Cemerlang, 2021*

Gambar 2.2 Kacang Hijau

Morfologi dari kacang hijau terdiri dari akar, batang, daun, bunga dan biji. Kacang hijau merupakan tanaman yang tumbuh tegak dengan ketinggian berkisar antara 30-130 cm. Biji kacang hijau berbentuk bulat kecil dan memiliki warna hijau kusam, hijau mengkilap dan kuning kecoklatan (Pratap dan Kumar, 2011). Biji

kacang hijau terdiri dari tiga bagian utama, yaitu kulit biji (10%), kotiledon (88%) dan lembaga (2%). Pada bagian kulit biji kacang hijau mengandung mineral seperti P, Ca dan Fe. Kotiledon banyak mengandung pati dan serat, sedangkan lembaga merupakan sumber protein dan lemak (Nisa dkk., 2016). Tabel 2.3 di bawah ini menunjukkan kandungan zat gizi yang dimiliki kacang hijau:

Tabel 2.3 Kandungan Zat Gizi Kacang Hijau

| No. | Jenis Nutrisi | Nilai per 100 g |
|---|---|---|
| 1. | Kalori | 347 kcal (1452 kJ) |
| 2. | Karbohidrat | 62,62 g |
| | Gula | 6,6 g |
| | Serat | 16,3 g |
| 3. | Air | 9,05 g |
| 4. | Protein | 23,86 g |
| 5. | Lemak | 1,15 g |
| 6. | Vitamin | |
| | Vitamin A | 114 IU |
| | Vitamin C | 4,8 mg |
| | Vitamin E | 0,51 mg |
| | Vitamin K | 9 µg |
| | Vitamin B1 (Thiamine) | 0,621 mg |
| | Vitamin B2 (Riboflavin) | 0,233 mg |
| | Vitamin B3 (Niacin) | 2,251 mg |
| | Vitamin B5 (Panthothenic acid) | 1,91 mg |
| | Vitamin B9 (Folat) | 625 µg |
| 7. | Mineral | |
| | Kalsium | 132 mg |
| | Zat Besi | 6,74 mg |
| | Magnesium | 189 mg |
| | Fosfor | 367 mg |
| | Potassium (Kalium) | 1,246 mg |
| | Sodium | 15 mg |
| | Selenium | 8,2 µg |
| | Seng (Zinc) | 2,68 mg |

*Sumber : USDA, 2007*

Kandungan protein pada kacang hijau sebanyak 230–260 g/kg dan sekitar 0,7-1,0 g/kg lemak dan mempunyai zat anti gizi dengan kadar yang sangat rendah. Kadar lemak yang rendah dalam kacang hijau menyebabkan bahan makanan/minuman yang terbuat dari kacang hijau tidak mudah tengik. Lemak

kacang hijau tersusun atas 73% asam lemak tak jenuh dan 27% asam lemak jenuh (Supriyono, 2008).

Kacang hijau memiliki banyak manfaat kesehatan seperti efek hipoglikemik dan hipolipidemis, antihipertensi, antikanker, hepatoprotektif dan imunomodulator dan anti inflamasi. Kacang hijau menempati urutan ketiga sebagai tanaman pangan kacang-kacangan terpenting setelah kedelai dan kacang tanah, sehingga dapat mengisi kekurangan protein secara umum, memperbaiki gizi dan sekaligus meningkatkan pendapatan petani (Nasution dkk., 2020). Kandungan gizi lain yang terkandung di dalamnya yaitu protein, lemak, vitamin (asam folat, vitamin B1, riboflavin, vitamin B6, asam pantotenat, niasin), dan mineral (kalium, fosfor, kalsium, magnesium, dan zat besi). Kacang hijau mengandung komponen bioaktif yaitu asam oleanolic yang berperan dalam mendiami penyakit kardiovaskular dan mendorong sistem kekebalan tubuh. Kacang hijau memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dan nutrisi semut terendah di antara kacang-kacangan lainnya (Sadiah dkk., 2017).

### 2.4.2. *Water Kefir Grains*

Bibit *water kefir* atau kristal alga merupakan bahan utama yang digunakan sebagai *starter* dalam membuat *water kefir*. Kristal alga memiliki bentuk seperti kembang kol dengan diameter tiap butirnya 2-15 mm yang mempunyai bobot hanya beberapa gram saja dan berwarna putih transparan dan mudah pecah jika terdapat penekanan (Schneedorf ,2012). Kristal alga mengandung bakteri asam laktat yang dapat menyebabkan terjadinya rasa asam pada *water kefir* dan khamir yang akan menghasilkan alkohol serta $CO_2$. Mikroorganisme utama yang ditemukan dalam *water kefir* adalah bakteri asam laktat (BAL), campuran khamir, dan bakteri asam asetat yang hidup bersimbiosis dan tumbuh di dalam kristal alga dalam perbandingan yang seimbang (Laureys dan De Vuyst, 2016). Butiran ini mengandung bahan kering sebanyak 10% yang terdiri atas karbohidrat 56%, protein 32%, polisakarida 24% dan komponen lainnya (Nadhiroh, 2018).

*Sumber : Lathif, 2016*

Gambar 2.3 *Water Kefir Grains*

Bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus sp.* dan *Streptococcus sp.* yang berbentuk batang akan menempati lapisan perifer (luar) pada kristal alga. Sedangkan khamir *Saccharomyces delbrucki* dan *Saccharomyces cerevisiae* akan menempati lapisan dalam (inti) pada kristal alga (Sari, 2020; Subroto, 2008). Bakteri asam laktat (BAL) pada *water kefir* bermanfaat di bidang kesehatan yakni sebagai probiotik penghasil senyawa antimikroba seperti bakteriosin dan hidrogen peroksida yang menekan pertumbuhan bakteri penyebab penyakit saluran pencernaan, meningkatkan fungsi pencernaan, dan penyerapan nutrisi makanan serta membantu memperlancar BAB (Bahar, 2008).

*Water kefir grains* yang memiliki keanekaragaman spesies yang berbeda, tetapi masih belum jelas yang merupakan mikroorganisme kunci selama proses fermentasi dan bagaimana keanekaragaman spesies mempengaruhi proses fermentasi. Spesies LAB *Lactobacillus hil-gardii* sering dikaitkan dengan fermentasi kefir air dan dianggap memiliki peran dalam pertumbuhan butir *water kefir* karena produksi EPSnya dari sukrosa (Waldherr dkk., 2010).

Bibit *water kefir* yang merupakan simbiosis antara berbagai jenis organisme yang bertujuan mensintesis asam organik dalam *water kefir* untuk pertumbuhan bibit itu sendiri. Bibit ini merupakan ekosistem unik yang yang berasal dari alam, dibentuk oleh hubungan simbiosis antara bakteri dan khamir (Pogacic dkk., 2013). Menurut Schneedorf (2012), strain mikroba yang terdapat dalam sampel bibit *water kefir* dapat dilihat pada Tabel 2.4 berikut:

Tabel 2.4 *Strain* Mikroba Bibit *Water Kefir*

| Bakteri | |
|---|---|
| *Acetobacter aceti* | *Lactobacillus collinoides* |
| *Chryseomonas luteola* | *Lactobacillus plantarum* |
| *Enterobacter hormachei* | *Lactobacillus fructiovorans* |
| *Gluconobacter frateuri* | *Lactobacillus hilgardii* |
| *Lactobacillus brevis* | *Lactobacillus kefir* |
| *Lactobacillus lactis cremoris* | *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* |
| *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* | *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* |
| *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* | *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* |
| *Lactobacillus buchneri* | *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* |
| *Lactobacillus kefiranofacien* | |
| *Lactobacillus casei* subsp. *casei* | |
| **Khamir** | |
| *Candida colliculosa* | *Kloeckera apiculata* |
| *Candida inconspicua* | *Kluyveromices lactis* |
| *Candida famata* | *Kluyveromices marxianus* |
| *Candida valida* | *Saccharomyces bayanus* |
| *Candida lambica* | *Saccharomyces..florentinus* |
| *Candida magnoliae* | *Saccharomyces cerevisiae* |
| *Candida kefyr* | *Saccharomyces pretoriensis* |
| *Hanseniaspora vinae* | *Torulaspora delbruechii* |
| *Hanseniaspora yalbensis* | *Zygosaccharamyces florentinus* |

*Sumber : Schneedorf, 2012*

Air dari kefir dapat meningkatkan pembentukan sistem imun dalam tubuh karena kandungan antimikrobia yang terdapat di dalamnya yaitu asam organik (asam laktat, asam asetat). Senyawa yang bersifat antimikrobia tersebut berasal dari hasil metabolisme mikroflora kefir yang dapat menghambat bakteri patogen spesifik seperti *Staphylococcus aureus, Leuconostoc sp., Listeria monocytogenes, Pediococcus sp.,* dan *Escherichia coli* (Farnworth, 2008). Beberapa jenis mikroflora tersebut merupakan kelompok bakteri asam laktat atau yang umumnya disebut BAL. Tujuan penggunaan BAL tersebut adalah untuk menambah nilai fungsional produk, dimana terjadi perlawanan terhadap bakteri patogen dalam saluran pencernaan (Narita, 2016; Maryana, 2014).

Menurut Cousens (2003) yang disebutkan dalam artikel Narita (2016), *kefir grains* berkualitas tinggi mengandung:

1. *Streptococcus lactis*, yang menghasilkan asam laktat, membantu pencernaan, menghambat mikroorganisme berbahaya, dan menghasilkan bacteriolysis.

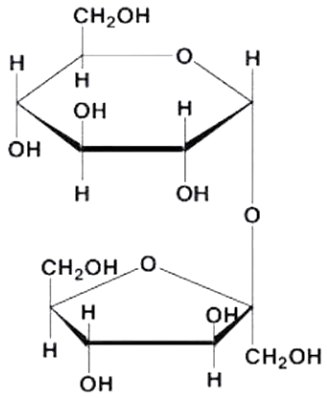
2. *Streptococcus cremoris*, yang memiliki sifat yang mirip *S. lactis*
3. *Lactobacillus plantarum,* yang membuat asam laktat, perkelahian melawan *Listeria monoctogenes* dan membuat plantaricin yang menghambat mikroorganisme yang menyebabkan pembusukan.
4. *Lactobacillus casei,* yang menghasilkan sejumlah besar L (+) asam laktat, berkolonisasi dengan baik di saluran pencernaan, menciptakan media yang menguntungkan bagi bakteri lain untuk tumbuh, menghambat pembusukan, meningkatkan fungsi kekebalan tubuh, dan menghambat bakteri patogen serta membantu melindungi terhadap infeksi bakteri.
5. *Streptococcus diacetylactis*, menghasilkan $CO_2$ dalam kefir, membuat diacetyl, yang memberikan kefir bau khas, dan memiliki sifat umum mirip *S. lactis*.
6. *Saccharomyces florentinus* dan *Leuconostoc cremoris*, yang tidak menyebabkan penyakit seperti *Candida albican*.

### 2.4.3. Sukrosa sebagai Sumber Karbon

Sukrosa merupakan disakarida yang paling manis dan terdiri dari dua molekul monosakarida, glukosa dan fruktosa. Sukrosa mempunyai daya larut tinggi, dapat menurunkan aktivitas air dan meningkatkan air. Sukrosa adalah disakarida yang apabila dihidrolisis berubah menjadi dua molekul monosakarida yaitu glukosa dan fruktosa (Zamzami, 2019). Proses hidrolisis sukrosa dapat dipercepat dengan penambahan asam. Penggunaan sukrosa dalam industri pangan berpotensi sebagai penambah cita rasa dan bahan pengawet.

Sukrosa dimanfaatkan dalam pembuatan *water kefir* sebagai sumber karbon bagi pertumbuhan bakteri asam laktat selama fermentasi. Hal tersebut dikarenakan perlakuan penambahan sukrosa diduga dapat memberikan nutrisi tambahan bagi bakteri asam laktat untuk metabolisme dan pertumbuhan sel, dengan tersedianya nutrisi yang optimal, maka aktivitas bakteri asam laktat akan meningkat sehingga menyebabkan jumlah asam hasil metabolisme juga meningkat. Asam laktat dan asetaldehid dapat menyebabkan penurunan pH media fermentasi atau meningkatkan keasaman dan menimbulkan aroma khas (Zamzami, 2019). Menurut Spreer (1998), asam laktat dan asetaldehid yang dihasilkan menyebabkan

penurunan pH media fermentasi atau meningkatkan keasaman dan menimbulkan aroma khas.




*Sumber : Lathif, 2016*

Gambar 2.4 Struktur Sukrosa

Bakteri asam laktat memanfaatkan sukrosa (gula) sebagai sumber energi untuk pertumbuhan. Bakteri tersebut menghasilkan metabolit berupa asam laktat selama proses fermentasi. Mikroba akan merombak senyawa karbon (sukrosa/gula) menjadi energi untuk pertumbuhan dan asam laktat sebagai metabolitnya. Mikroba membutuhkan gula untuk aktivitas metabolisme dan perkembangbiakan sel. Hal tersebut berkaitan dengan peningkatan jumlah sel bakteri. Semakin banyak sel bakteri yang ada maka sukrosa akan semakin banyak digunakan untuk metabolisme sel. Rahmawati (2006), menyatakan bahwa peningkatan jumlah bakteri menyebabkan terjadinya peningkatan perombakan senyawa gula yang ada pada medium menjadi asam–asam organik.

Sukrosa merupakan sumber energi yang dibutuhkan mikroorganisme selama fermentasi berlangsung. Penggunaan level sukrosa pada pembuatan kefir dapat mempengaruhi kualitas kefir meliputi cita rasa dan sifat sensoris. Banyaknya sukrosa yang dimanfaatkan selama fermentasi tergantung pada jenis mikroba yang digunakan (Tamime, 2011). Penambahan sukrosa berpengaruh terhadap aroma yang dihasilkan, semakin banyak penambahan sukrosa maka aroma yang terbentuk semakin kuat. Aroma yang menyerupai tape disebabkan karena adanya alkohol dan ester yang tinggi (Usmiati, 2007). Sukrosa (gula) berpengaruh sebagai sumber energi pertumbuhan bakteri asam laktat. *Lactobacillus bulgaricus* berperan dalam menghasilkan asam laktat sedangkan *Streptococus lactis* lebih berperan dalam pembetukan aroma dan flavor (cita rasa). Menurut Hartatie (2011), bahwa aroma

pada produk fermentasi yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan produk tersebut. Berdasarkan penelitian Rumeen (2017), menunjukkan bahwa kefir dengan penggunaan level sukrosa 6% merupakan kefir yang paling disukai oleh panelis berdasarkan pengujian sensoris terhadap warna, aroma, kekentalan, dan cita rasa.

## 2.5. Medium Pertumbuhan *Water Kefir*

Dalam proses metabolism bibit *water kefir*/kefir air, medium pertumbuhan yang utama digunakan adalah sukrosa dan kismis. Kismis atai *raisin* adalah anggur yang telah melalui proses pengeringan sebelum akhirnya diolah menjadi bahan campuran makanan lain atau dapat juga dimakan langsung. Kismis mempunyai ukuran yang kecil dengan jumlah 6 buah/ 10 gram, tetapi mengandung kalori sebesar 229 kcal/ 100 gram dan kadar gula sebesar 59 gram/ 100 gram dimana kandungan fruktosa dan glukosa yang terdapat di dalamnya berperan memberi suplai energi ke tubuh. Manfaat kismis dalam pertumbuhan bibit *water kefir* adalah sebagai nutrisi tambahan dalam air rendaman *water kefir* dan juga sebagai sumber gula untuk pertumbuhan sel sehingga bermanfaat untuk dikonsumsi (Lathif, 2016; Laseduw, 2012). Media pertumbuhan *water kefir* lainnya yang dikenal dengan nama sukrosa, dihasilkan dari tanaman seperti sayuran dan buah-buahan dengan jalan mengkondensasikan glukosa dan fruktosa. Beberapa diantaranya seperti tebu dan bit gula, mengandung sukrosa dalam jumlah relative besar sekitar 15%. (Lathif, 2016; Ramona, 1997).

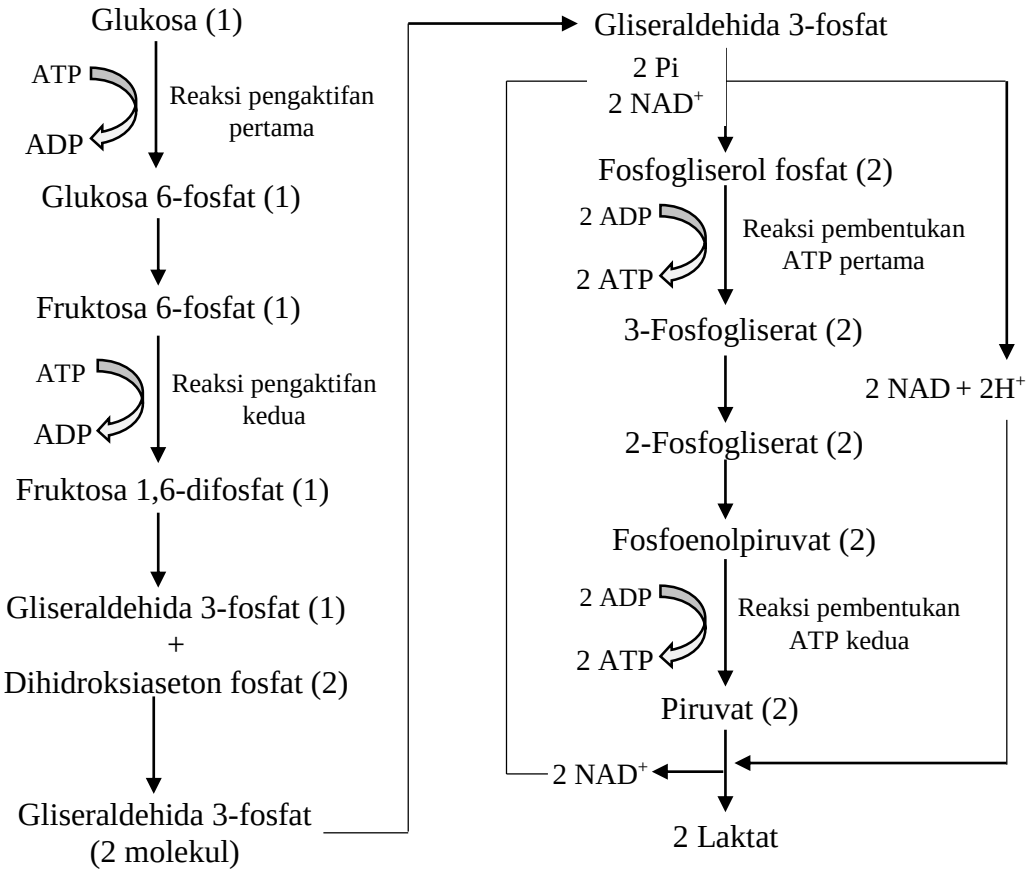
## 2.6. Proses Fermentasi *Water Kefir*

Fermentasi merupakan suatu proses terjadinya perubahan kimia pada suatu substrat organik melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Bioteknologi berbasis fermentasi sebagian besar menerapkan teknologi fermentasi atau yang menggunakan mikroorganisme untuk memproduksi makanan dan minuman contohnya seperti: keju, yoghurt, kefir, dll (Faridah dan Sari, 2019).

Proses fermentasi kefir diproduksi dengan menggunakan *starter* yang sering disebut “biji kefir” (*kefir grains*) atau *water kefir grains*, bakteri berperan menghasilkan asam laktat dan komponen pembentuk rasa asam, sedangkan ragi

menghasilkan gas karbon dioksida dan sedikit alkohol. Itulah yang menyebabkan rasa kefir di samping asam juga sedikit ada rasa alkohol dan soda, yang membuat rasa kefir lebih segar (Nursari, 2019).

Pada tahap pertama fermentasi *water kefir* dimulai dengan mengkonversi sukrosa menjadi D-glukosa dan D-fruktosa dengan bantuan enzim sukrase (Lehninger, 1990). Selanjutnya glukosa dikonversi menjadi asam piruvat yang disebut glikolisis glukosa melalui Jalur Embden-Meyerhof Parnas (EMP). Glikolisis merupakan proses penguraian molekul glukosa yang memiliki 6 atom karbon secara enzimatik di dalam urutan 10 reaksi enzimatik, untuk menghasilkan 2 molekul piruvat yang memiliki 3 atom karbon, lintasan glikolisis anaerobik dapat dilihat pada Gambar 2.5 berikut (Lathif, 2016; Lehninger, 1990) :




*Sumber : Lathif, 2016*

Gambar 2.5 Reaksi Kimia Pembentukan Asam Laktat

Keterangan : lintasan glikolisis yang memiliki 2 fase, yaitu fase pertama (1) fosforilasi glukosa dan pengubahnya menjadi gliseraldehida 3-fosfat

dan fase kedua (2) pengubahan gliseraldehida 3-fosfat menjadi laktat dan pembentukan ATP yang terjadi secara bersamaan.

Menurut Supriyono (2008), proses fermentasi bakteri asam laktat pada kefir terbagi atas dua jenis, yaitu homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif hanya menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir metabolisme glukosa dengan menggunakan jalur EMP. Dalam heterofermentatif akan dibentuk komponen flavor yakni asam laktat, $CO_2$, dan etanol atau asam asetat dari gula melalui jalur fosfoketolase. Beberapa contoh genus yang merupakan bakteri homofermentatif dalam *strain water kefir grains* adalah *Lactococcus* dan beberapa bakteri *Lactobacillus* seperti spesies *Lactobacillus casei*. Sedangkan contoh genus bakteri heterofermentatif yaitu *Leuconostoc* dan beberapa bakteri *Lactobacillus* seperti spesies *Lactobacillus brevis* (Irianto, 2013). Mekanisme reaksi fermentasi kefir dapat dilihat pada Gambar 2.6 berikut:

$$\underset{\text{Glukosa}}{C_{12}H_{12}O_6} \xrightarrow{\textit{glikolisis}} \underset{\text{Asam piruvat}}{2C_3H_4O_3}$$

$$\underset{\text{Asam piruvat}}{2C_3H_4O_3} \xrightarrow{\textit{dehidrogenase}} \underset{\text{Asam laktat}}{2C_3H_6O_3}$$

$$\underset{\text{Glukosa}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\textit{khamir}} \underset{\text{Etanol}}{C_2H_5OH} + \underset{\text{Karbon dioksida}}{CO_2}$$

*Sumber : Zamzami, 2019*

Gambar 2.6 Mekanisme Reaksi Fermentasi Kefir

Secara garis besar kedua jenis fermentasi tersebut memiliki kesamaan dalam mekanisme pembentukan asam laktat, yaitu piruvat akan dirubah menjadi laktat dan diikuti dengan proses transfer elektron dari NADH menjadi $NAD^+$. Pola fermentasi ini dapat dibedakan dengan mengetahui keberadaan enzim-enzim yang berperan dalam jalur metabolisme glikolisis. Pada fermentasi heterofermentatif, tidak digunakan enzim aldose dan heksose tetapi menggunakan enzim fosfoketolase dan menghasilkan $CO_2$. Metabolisme heterofermentatif dengan menggunakan heksosa akan menggunakan jalur heksosa monofosfat atau pentosa fosfat. Sementara itu,

proses fermentasi homofermentatif melibatkan aldose dan heksose, tetapi tidak memiliki fosfoketolase serta hanya sedikit atau sama sekali tidak menghasilkan $CO_2$. Jalur metabolisme yang digunakan pada homofermentatif adalah lintasan *Embden- Meyerhof-Parnas* (EMP) (Lathif, 2016; Irianto, 2013).

Tahap kedua fermentasi etanol yaitu proses dimana asam piruvat akan diubah menjadi etanol. Fermentasi etanol merupakan proses serupa dengan glikolisis namun melalui asetaldehida asam piruvat dalam kondisi anaerob akan dikonversi oleh piruvat dekarbosilase menjadi asetaldehid, selanjutnya asetaldehid diubah oleh alkohol dehidrogenase menjadi etanol dan karbondioksida (Nursari, 2019). Proses fermentasi etanol berbeda dari glikolisis karena khamir tidak mengandung dehidrogenase laktat, namun terdapat 2 reaksi sebagai gantinya yaitu piruvat dekarboksilase dan etanol dehidrogenase. Sebanyak 2 mol piruvat juga dihasilkan dalam tahap ini. Tahap ketiga adalah piruvat diubah menjadi asetaldehida oleh enzim piruvat dekarboksilase, lalu asetildehida tereduksi menjadi etanol yang menghasilkan tenaga pereduksi melalui kerja enzim etanol dehidrogenase. Reaksi kimia dari proses tersebut dijelaskan sebagai berikut (Lehninger, 1990) :

$$\underset{\text{(glukosa)}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{+ (sumber enzim)}}{\text{khamir}} \longrightarrow \underset{\text{(etanol)}}{C_2H_5OH} + 2CO_2 + \text{energi}$$

Tahap terakhir adalah peranan dari satu-satunya bakteri yang berasal dari genus *Acetobacter*, yaitu peran dari bakteri *Acetobacter aceti* dalam kultur starter *water kefir* ini, akan merubah etanol menjadi asam asetat. Perubahan yang terjadi tersebut disebabkan oleh adanya proses asetifikasi dari etanol menjadi asam asetat yang ditimbulkan sebagai akibat dari aktifitas bakteri tersebut (Lathif, 2016; Timotius, 1982). Reaksi kimia yang terjadi dari perubahan etanol menjadi asam asetat dapat dilihat pada reaksi di bawah ini :

$$\underset{\text{(etanol)}}{C_2H_5OH} + O_2 \longrightarrow \underset{\text{(asam asetat)}}{CH_3COOH} + H_2O + \text{energi}$$

Metabolisme bakteri *Acetobacter aceti* bersifat aerobik, dimana akan mengoksidasi etanol menjadi asam asetat. Mekanisme fermentasi asam asetat dibagi menjadi dua tahap, yaitu fermentasi etanol dan fermentasi asam asetat Pada fermentasi etanol, diawali dengan gula yang terdapat pada bahan baku diubah oleh

khamir menjadi etanol dan CO2, yang berlangsung secara anaerob. Setelah etanol dihasilkan, maka segera diubah menjadi asam asetat oleh bakteri asam asetat secara aerob (Puspaningsih, 2009).

## 2.7. Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri yang bermanfaat untuk peningkatan kualitas dan keamanan bahan pangan melalui penghambatan secara alami terhadap mikroorganisme yang bersifat patogen. Hal tersebut dikarenakan BAL menghasilkan beberapa komponen antimikrobia yaitu asam organik, karbon dioksida, hidrogen peroksida, diasetil, reuterin, dan bakteriosin (Amezquita dan Brashears, 2002). Menurut Jenie dkk. (2002), sebagian dari senyawa-senyawa tersebut memperlihatkan aktivitas antimikrobia terhadap banyak mikroorganisme perusak dan patogen makanan seperti *Bacillus cereus, Clostridiumbotulinum, Clostridium perfringens, Pseudomonas, Alcaligenes,* dan lain-lain. Asam organik yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat adalah asam laktat dan asam asetat. Asam laktat merupakan metabolit utama bakteri asam laktat. Efek penghambatan terjadi karena molekul asam organik masuk ke dalam membran sel dan menurunkan pH sitoplasma (Hidayati, 2018; Mishra dan Lambert, 1996).

*Lactobacillus* merupakan salah satu BAL yang merupakan bakteri yang berbentuk batang, non-motile, gram-positif, dan bersifat negatif pada uji katalase dan oksidase. *Lactobacillus* banyak terdapat dalam makanan fermentasi, susu, keju dan beberapa genus *Lactobacillus* ternyata ditemukan di beberapa buah-buahan. *Lactobacillus* sering disebut juga kelompok bakteri asam laktat. Hal ini disebabkan kemampuannya dalam mengubah laktosa dan gula lainnya menjadi asam laktat (Hidayati, 2018).

## 2.8. Khamir

Khamir merupakan mikrorganisme kemoor-ganotrop karena khamir menggunakan senyawa organik sebagai sumber energi dan tidak memerlukan sinar untuk pertumbuhannya. Nutrisi karbon didapatkan dari gula heksosa seperti glukosa dan fruktosa, atau disakarida seperti sukrosa dan maltosa. Khamir juga menyebar luas di alam serta sangat sering ditemukan pada produk pangan dengan

kadar gula tinggi. Menurut Frazier dan Westhoff (2003), terdapat 6 (enam) faktor yang mempengaruhi pertumbuhan dan aktivitas khamir diantaranya: kelembaban, konsentrasi oksigen, suhu, nutrien, pH, dan ada tidaknya senyawa penghambat. Khamir mempunyai kisaran pH pertumbuhan 1.5-8.5, namun kebanyakan khamir lebih cocok tumbuh pada kondisi asam, yaitu pada pH 4-4.5 (Hidayati, 2018).

Suhu lingkungan yang optimum untuk pertumbuhan khamir adalah 25-30°C dan suhu maksimum 35-47°C. Khamir tumbuh baik pada kondisi aerobik, tetapi khamir fermentatif dapat tumbuh secara anaerobik meskipun lambat. Khamir hanya sedikit resisten terhadap pemanasan, dimana kebanyakan khamir dapat terbunuh pada suhu 60°C (Barnett dan Pankhurst, 2000). Beberapa khamir yang telah diketahui mampu memfermentasi glukosa dan menghasilkan etanol serta karbon dioksida adalah *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, dan *Zygosaccharomyces* (Yarrow, 1998). Dalam proses fermentasi yang melibatkan beberapa mikroba, khamir memiliki peran secara tidak langsung menyediakan nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba lain seperti asam amino dan vitamin, mengkondisikan pH, memproduksi etanol, dan $CO_2$ yang dihasilkan dalam proses metabolisme. Kemampuan khamir memetabolisme asam piruvat menjadi alkohol sangat penting dalam proses fermentasi kefir. Alkohol yang terbentuk selama proses fermentasi adalah salah satu ciri khas kefir yang membedakan kefir dengan yoghurt. (Hidayati, 2018).

## 2.9. Faktor yang Mempengaruhi Fermentasi Kefir

a. Substrat (Medium)

Medium fermentasi menyediakan semua zat gizi yang diperlukan mikroba untuk memperoleh energi, pertumbuhan, dan bahan pembentuk sel serta biosintesa produk-produk metabolisme. Berbagai macam substrat dapat dipakai untuk melakukan proses fermentasi yaitu molasses, pati, laktosa, glukosa dan sukrosa sebagai sumber karbon. Sedangkan asam amino, protein, nitrat, garam ammonium, tepung kedelai dan sisa fermentasi sebagai sumber nitrogen. Selain untuk memenuhi pertumbuhan sel dan pembentukan produk fermentasi, medium yang digunakan akan berpengaruh terhadap pH, pembentukan buih, dll (Febrianto, 2018; Rahman, 1989).

b. Temperatur

Temperatur fermentasi merupakan salah satu faktor yang menentukan jenis mikroba yang dominan selama fermentasi. Contohnya *Lactobacillus bulgaricus* yang termasuk dalam kelompok Bakteri Asam Laktat pada umumnya suhu pertumbuhan optimum 40-45°C, sedangkan khamir mempunyai suhu pertumbuhan optimum pada 20-30°C. Sehingga proses fermentasi sangat sensitif terhadap perubahan suhu. Jika konsentrasi asam yang diinginkan telah tercapai, maka suhu dapat dinaikkan untuk menghentikan fermentasi (Febrianto, 2018; Rahman, 1989).

c. Waktu Fermentasi

Pertumbuhan mikroba dipengaruhi oleh lamanya waktu berpengaruh terhadap. Pertumbuhan awal yang terlihat jika suatu sel mikroorganisme diinokulasikan pada nutrien agar adalah pembesaran ukuran, volume dan berat sel. Sel-sel terus membelah secara cepat (eksponensial). Selama kondisi yang memungkinkan, maka pertumbuhan dan pembelahan sel berlangsung sampai sejumlah besar populasi sel terbentuk (Kunaepah, 2008; Buckle dkk., 1985).

Waktu antara pembelahan sel berbeda-beda tergantung spesies bakteri dan kondisi lingkungannya. Tipe pertumbuhan yang cepat tersebut disebut juga pertumbuhan logaritmik, karena apabila jumlah sel digambarkan terhadap waktu akan menunjukkan garis lurus. Tetapi tipe pertumbuhan logaritmik ini tidak langsung terjadi pada saat sel dipindahkan pada nutrien agar dan tidak terjadi secara terus menerus. Lama waktu fermentasi akan berpengaruh terhadap metabolit primer yang dihasilkan dalam proses fermentasi seperti asam laktat dan alkohol. Hal ini dikarenakan semakin lama waktu fermentasi, maka mikroba akan terus berkembang biak dan jumlahnya bertambah sehingga kemampuan untuk memecah substrat/glukosa menjadi asam laktat dan alkohol juga semakin besar. Ketika substrat mulai habis (*fase decay*/menuju kematian), mikroba menghasilkan aktivitas antibakteri untuk mempertahankan kondisi fisiologis (Kunaepah, 2008).

d. pH (keasaman)

Pada umumnya, suatu makanan yang mengandung asam dapat bertahan lama. Beberapa hasil fermentasi terutama asam dapat mencegah pertumbuhan mikroba yang memiliki sifat beracun di dalam makanan, contohnya *Colistridium botulinum* pada pH dibawah 4,6 tidak dapat tumbuh dan membentuk toksin. Namun jika

jumlah oksigen tercukupi dan khamir dapat tumbuh serta fermentasi berlangsung terus-menerus, maka daya awet asam tersebut akan hilang. Pada keadaan ini, mikroba proteoilitik dan lipolitik dapat berkembang biak (Febrianto, 2018; Rahman, 1989).

Contohnya pada proses fermentasi susu. Susu segar pada umumnya akan terkontaminasi dengan beberapa macam mikroba yang dominan yaitu *Streptococcus lactis*, sehingga dapat menghasilkan asam laktat. Tetapi pertumbuhan selanjutnya bakteri ini akan terhambat oleh keasaman yang dihasilkan bakteri itu sendiri. Oleh karena itu, bakteri tersebut akan menjadi inaktif sehingga kemudian akan tumbuh bakteri jenis *Lactobacillus* yang lebih toleran terhadap asam daripada *Streptococcus*. Bakteri jenis *Lactobacillus* akan menghasilkan asam lebih banyak sampai jumlah tertentu yang dapat menghambat pertumbuhannya, karena pada keasaman yang tinggi *Lactobacillus* akan mati, kemudian tumbuh khamir yang lebih toleran terhadap asam. Khamir akan mengoksidasi asam sedangkan ragi akan menghasilkan hasil-hasil akhir yang bersifat basa dari reaksi proteolisis, sehingga keduanya akan menurunkan asam sampai titik di mana bakteri pembusuk proteolitik dan lipolitik akan mencerna "curd" dan menghasilkan gas serta bau busuk (Kunaepah, 2008).

e. Oksigen

Selama proses fermentasi, oksigen diatur untuk memperbanyak atau menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Setiap mikroba memerlukan oksigen yang jumlahnya berbeda pertumbuhan atau membentuk sel-sel baru, dan untuk fermentasi. Misalnya ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) akan tumbuh lebih baik pada keadaan aerobik, tetapi akan melakukan fermentasi terhadap gula jauh lebih cepat pada keadaan anaerobik. *Candida kefir* adalah salah satu khamir yang melakukan fermentasi secara anaerob, sedangkan *Lactobacillus bulgaricus* merupakan bakteri yang bersifat fakultatif anaerob. Dan juga misalnya bakteri *Acetobacter* yang penting dalam pembuatan cuka adalah bakteri aerobik yaitu bakteri yang memerlukan oksigen, atau ragi yang menghasilkan alkohol dari gula akan lebih baik dalam keadaan anaerobik (Febrianto, 2018; Winarno dkk., 1980).

f. Mikroba

Proses fermentasi biasanya dilakukan dengan menggunakan kultur murni yang dihasilkan di laboratorium. Kultur tersebut dapat disimpan dalam keadaan kering atau dibekukan, misalnya kultur murni dari bakteri asam laktat. Kadang-kadang tidak digunakan kultur murni untuk fermentasi selanjutnya tetapi menggunakan *starter* (Winarno, 1989). Fermentasi timbul sebagai hasil metabolisme tipe anaerobik. Semua organisme membutuhkan sumber energi yang didapatkan dari metabolisme bahan pangan. Bahan baku energi yang paling banyak digunakan diantara mikroorganisme adalah glukosa. Beberapa mikroorganisme dapat melakukan metabolisme tanpa adanya oksigen. Zat – zat produk akhir ini termasuk sejumlah besar asam laktat, asam asetat dan etanol serta sejumlah kecil asam organik volatil lainnya, alkohol dan ester dari alkohol tersebut (Febrianto, 2018; Buckle, 2010).

Organisme anaerobik juga menghasilkan energi, yaitu melalui reaksi – reaksi yang disebut fermentasi yang menggunakan bahan organik sebagai donor dan akseptor elektron. *Streptococcus lactis*, bakteri yang menyebabkan asamnya susu, mengubah glukosa menjadi asam laktat, yang berakumulasi di dalam medium sebagai produk fermentasi. Melalui glikolisis, satu molekul glukosa diubah menjadi dua molekul asam piruvat disertai dengan pembentukan dua NADH + $H^+$. asam piruvat tersebut diubah menjadi asam laktat dalam reaksi tersebut. (Febrianto, 2018; Pelczar, 1986).

Fermentasi dapat terjadi karena adanya aktivitas mikroba penyebab fermentasi pada substrat organik yang sesuai. Terjadinya fermentasi ini dapat menyebabkan perubahan sifat bahan pangan sebagai akibat dari pemecahan kandungan-kandungan bahan pangan (Febrianto, 2018; Winarno dkk., 1980). Pada umumnya cara-cara pengawetan pangan ditujukan untuk menghambat atau membunuh mikroba sebaliknya fermentasi adalah suatu cara pengawetan yang mempergunakan mikroba tertentu untuk menghasilkan asam atau komponen lainnya yang dapat menghambat mikroba perusak lainnya. Fermentasi secara teknik dapat didefinisikan sebagai suatu proses oksidasi anaerobik atau partial anaerobik dari karbohidrat dan menghasilkan alkohol serta beberapa asam. Namun banyak proses fermentasi yang menggunakan substrat protein dan lemak (Muchtadi, 1989).

Prinsip fermentasi sebenarnya adalah mengaktifkan pertumbuhan dan metabolisme dari mikroba pembentuk alkohol dan asam, dan menekan pertumbuhan mikroba proteolitik dan lipolitik (Febrianto, 2018).

Simbiosis antara bakteri dan khamir akan menjaga keseimbangan alkohol yang dihasilkan dalam proses fermentasi *water kefir*, sehingga kadar alkohol yang dihasilkan akan tetap toleran terutama dalam rentang fermentasi yang lebih pendek. Oleh karena itu, *water kefir* adalah halal sebab manfaatnya yang besar untuk kesehatan tanpa kandungan alkoholnya (Nadhiroh, 2018).