

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Deskripsi Sifat dan Karakteristik Kristal alga

Menurut Pogacic dkk. (2013), kristal alga sampai saat ini belum jelas asal-usulnya. Kristal alga memiliki karakteristik yang serupa dengan butiran yang memiliki sebutan "tanaman gingerbeer", yang dibawa kembali oleh tentara Inggris dari perang Krimea pada tahun 1855 (Ward, 1892) atau "Tibi grain" (Lutz, 1899). Kristal alga memiliki nama lain (sinonim) yang dikumpulkan oleh Kebler misalnya "California beer", "Afrika beer", "Ale nuts", "Balm of Gilead" dan "Japanese Beer Seeds" (Kebler, 1921).

Kristal alga atau *water kefir* adalah minuman fermentasi buatan pada medium berupa larutan sukrosa dengan tambahan berbagai buah-buahan kering dan segar (Alsayadi dkk, 2013). Persiapan pembuatan air fermentasi kristal alga dilakukan dengan cara butiran kristal alga dimasukkan ke dalam larutan sukrosa 8%, buah-buahan kering (contoh : buah ara) dan beberapa irisan lemon (Pidoux, 1989). Menurut Anfiteatro dan Schneedorf. (2004), fermentasi berjalan selama satu atau dua hari pada suhu 25°C dengan hasil air keruh, berkarbonasi, berwarna kuning jerami, berasa asam, memiliki kandungan gula rendah, dan beraroma etanol.

Bakteri yang terkandung dalam kristal alga menghasilkan asam laktat yang merangsang pertumbuhan khamir dan khamir menghasilkan faktor pendukung pertumbuhan bakteri kristal alga (Febrisiantosa dkk., 2013). Air rendaman kristal alga dapat meningkatkan pembentukan sistem imun dalam tubuh. Kristal alga

(Gambar 1) merupakan simbiosis antara berbagai jenis organisme yang bertujuan mensintesis asam organik dalam kristal alga untuk pertumbuhan kristal alga (Schneedorf, 2012). Kristal alga merupakan ekosistem unik yang berasal dari alam, dibentuk oleh hubungan simbiosis antara bakteri dan khamir (Pogacic dkk., 2013). Sebuah komunitas mikrobial kompleks dari kristal alga mengandung lebih dari 50 jenis bakteri dan khamir (berdasarkan asal kristal alga dan jenis medium) (Angulo dkk., 1993). Nisbah dan jumlah individu pada spesies mikrobial dalam sebutir kristal alga bergantung secara signifikan pada asal-usul dan metode pembudidayaannya (Koroleva, 1988).

Menurut Schneedorf (2012), kultur kristal alga memiliki tekstur dan medium yang berbeda dibandingkan *culture milk kefir grain*. Butiran kristal alga bersifat tegas, transparan dan mudah pecah dengan sedikit penekanan. Kristal alga tidak seperti gel atau lendir seperti tekstur yang dimiliki *milk kefir-grains* dan tidak berwarna putih pekat (Anfiteatro dan Schneedorf, 2004).



Gambar 1. Kristal Alga (Anfiteatro dan Schneedorf., 2004)

Keterangan : kristal alga dengan medium gula pasir putih pada gambar tengah dan kristal alga dengan medium susu di sebelah kanan dan kiri

Menurut Anfiteatro dan Schneedorf. (2004), para ilmuwan mengetahui kemampuan organisme dari kristal alga dalam melakukan fermentasi dalam medium rendah kandungan nitrogen dan faktor pertumbuhan (seperti pH, suhu, dan kondisi lingkungan), yang telah berjalan selama bertahun-tahun tanpa adanya modifikasi terhadap keseimbangan antara mikroorganisme yang berbeda.

### **B. Kandungan Kristal alga**

Menurut Codex Alimentarius (2003), populasi mikrobial kristal alga harus berisi *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, dan *Acetobacter* (diolah dari biji-bijian kristal alga) dan khamir yang memfermentasikan laktosa (*Kluyveromyces marxianus*) serta khamir yang memfermentasi sukrosa (*Saccharomyces cereviceae* dan *Saccharomyces exiguous*) ketika butiran kristal alga digunakan untuk kultur.

Menurut Anfiteatro dan Schneedorf (2004), mikroorganisme yang ditemukan dalam air fermentasi kristal alga, terbagi menjadi empat kelompok genus : *Lactobacillus*, *Streptococcus/ Lactococcus*, khamir dan *Acetobacter* (*Acetobacter aceti* dan *Acetobacter rasens*). Strain mikrobial yang terdapat dalam sampel kristal alga dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Strain Mikrobial Kristal Alga

Bakteri	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Acetobacter aceti</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus fructiovorans</i>
<i>Lactobacillus keranofaciens</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactobacillus mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
<i>Lactobacillus mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	<i>Enterobacter hormachei</i>
<i>Gluconobacter frateuri</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
Khamir	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces florentinus</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Hanseniaspora viniae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Candida colliculosa</i>	<i>Toruspola delbruechii</i>
<i>Candida inconspicua</i>	<i>Candida magnoliae</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>

Sumber : (Schneedorf, 2012)

### C. Medium Pertumbuhan Kristal Alga

Medium pertumbuhan kristal alga yang utama digunakan ialah sukrosa dan kismis untuk proses metabolisme kristal alga. Kismis atau *raisin* adalah anggur yang telah melalui proses pengeringan sebelum akhirnya diolah menjadi bahan campuran makanan lain atau dimakan langsung (Laseduw, 2012). Menurut Laseduw (2012), kismis mempunyai ukuran kecil dengan jumlah 6 biji/ 10 gram, namun mempunyai kalori sebesar 299 kcal/ 100 gram karena mengandung kadar gula 59 gram /100 gram sehingga makanan ini menjadi makanan yang disukai oleh anak-anak. Kismis mengandung fruktosa dan glukosa yang memberi suplai energi ke tubuh. Kismis mengandung berbagai vitamin, mineral dan senyawa

yang penting bagi kesehatan (Laseduw, 2012). Kandungan gizi dan mineral pada kismis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan Gizi dan Mineral Kismis

Komponen	Per 100 gram	Komponen	Per 100 gram
Energi	1.252 kJ (299 kcal)	Magnesium	35 mg
Karbohidrat	79 g	Fosfor	115 mg
Gula	59 g	Zink	0,32 mg
Diet serat	4 g	Tembaga	0,363 mg
Lemak	0,5 g	Mangan	0,308 mg
Protein	3 g	Selenium	0,7 mkg
Kalsium	50 mg (5%)	Vitamin C	3,2 mg
Besi	1,9 mg (15%)	Riboflavin	0,19 mg
Kalium	750 mg (16%)	Niasin	1,142 mg
Sodium	11 mg (0%)	Folat	3 mkg
Air	14,9 g	Vitamin E	0,12 mkg
Protein	3,39 g	Vitamin K	3,5 mkg
Abu	1,66 g		

Sumber : Laseduw (2012)

Menurut Laseduw (2012), anggur memiliki kandungan gula 13,2 gram sehingga digunakan sebagai nutrisi bagi kristal alga. Buah digunakan sebagai nutrisi tambahan dalam air rendaman kristal alga karena selain sebagai sumber gula untuk pertumbuhan sel namun juga berfungsi untuk memberikan vitamin dan mineral yang bermanfaat untuk dikonsumsi. Kandungan gula dalam buah dapat dilihat pada Tabel 4.

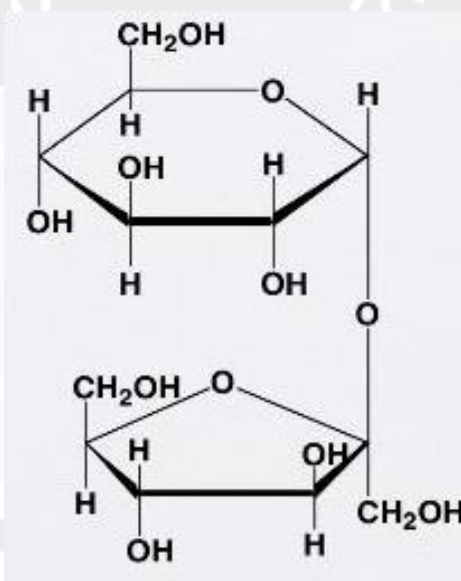
Tabel 4. Kandungan Gula dalam Buah-buahan

Buah (per 85 gram)	Total gula (gram)	Total kalori (Kcal)
Pisang	10,4	76
Ceri	10,9	54
Delima	11,6	71
Mangga	12,6	55
Anggur	13,2	59

Sumber : Laseduw (2012)

Sukrosa dikenal sehari-hari dalam rumah tangga sebagai gula dan dihasilkan tanaman dengan jalan mengkondensasikan glukosa dan fruktosa

(Ramona, 1997). Struktur sukrosa ditunjukkan pada Gambar 2. Sukrosa didapatkan dalam sayuran dan buah-buahan. Beberapa diantaranya seperti tebu dan bit gula, mengandung sukrosa dalam jumlah yang relatif besar. Gula diekstrak secara komersial dari tanaman tebu dan bit gula. Gula tebu maupun gula bit mengandung sukrosa kira-kira 15% (Ramona, 1997)



Gambar 2. Struktur Sukrosa (Sumber : Ramona, 1997)

Keterangan : Struktur kimia sukrosa (gula pasir) sebagai medium pertumbuhan kristal alga merupakan gabungan dari monosakarida glukosa dan fruktosa

Sumber karbon untuk mikrobia dapat berbentuk senyawa organik dan ada pula yang dapat menggunakan senyawa anorganik sebagai sumber karbon utama (Ramona, 1997). Khamir menggunakan sumber karbon sebagai penyusun bahan-bahan organik sel dan juga sebagai sumber energi. Gula merupakan sumber karbon yang merupakan komponen penting dalam fermentasi etanol oleh khamir (Lehninger, 1990).

Menurut Anfiteatro dan Schneedorf (2004), sangat penting bahwa kristal alga tumbuh dengan baik, untuk menghasilkan minuman kesehatan. Satu-satunya

cara kristal alga akan tumbuh dengan baik jika diberi larutan sukrosa atau gula tebu. Menurut Ramona (1997), organisme membutuhkan sukrosa (disakarida) sehingga mereka dapat memecahnya menjadi dua bentuk dasar atau gula rantai tunggal (monosakarida) yaitu glukosa dan fruktosa.

#### **D. Fermentasi Kristal Alga**

Fermentasi adalah proses dasar untuk mengubah suatu bahan menjadi suatu bahan lain dengan cara sederhana dan dibantu oleh mikrobia. Proses fermentasi ini merupakan bioteknologi sederhana (Belitz dkk., 2009). Fermentasi merupakan suatu reaksi oksidasi-reduksi di dalam sistem biologi yang menghasilkan energi, yang sebagai pendonor dan aseptor elektron digunakan senyawa organik (Lehninger, 1990). Fermentasi terbagi atas dua jenis, yakni homofermentatif dan heterofermentatif. Homofermentatif adalah fermentasi yang produk akhirnya hanya berupa asam laktat (contoh : pembuatan yoghurt). Heterofermentatif adalah fermentasi yang produk akhirnya berupa asam laktat dan etanol sama banyak (contoh : proses fermentasi yang terjadi dalam pembuatan fermentasi kristal alga) (Belitz dkk., 2009).

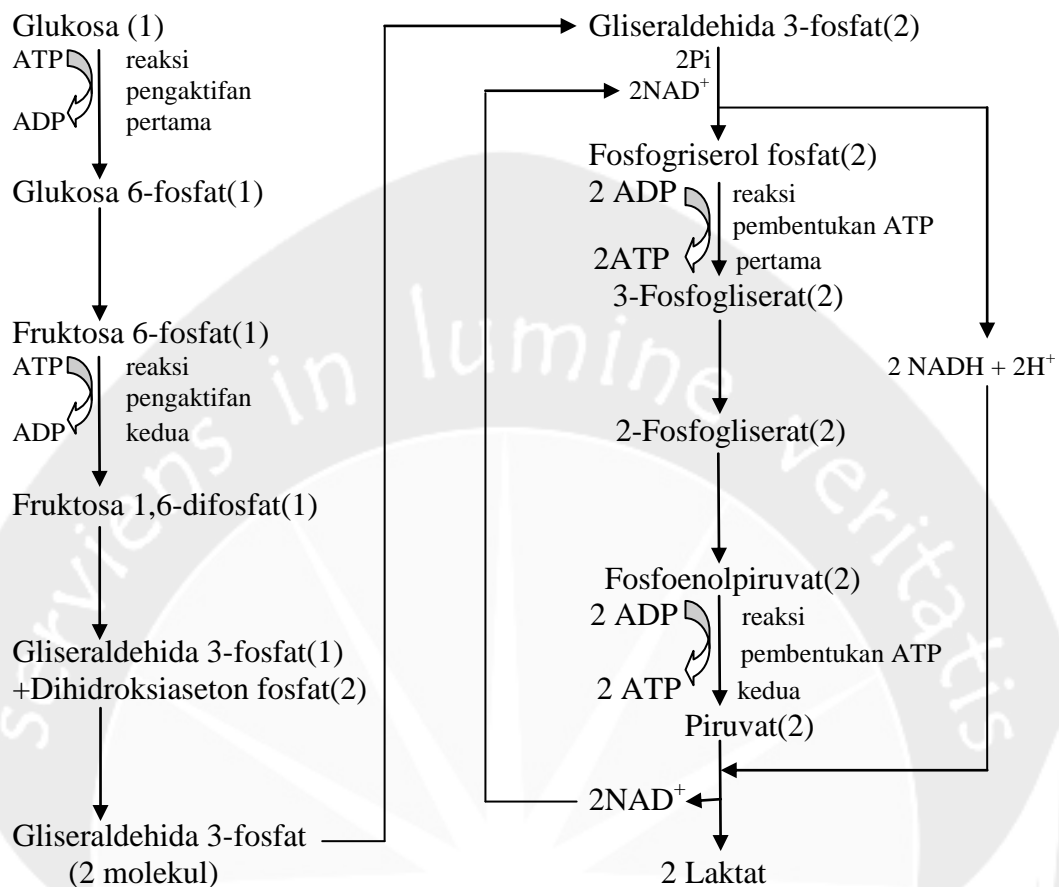
Senyawa organik yang biasa digunakan adalah karbohidrat dalam bentuk glukosa. Senyawa tersebut akan diubah oleh reaksi reduksi dengan katalis enzim menjadi suatu bentuk lain misalnya aldehida dan dapat dioksidasi menjadi asam (Winarno dan Fardiaz, 1981). Katabolisme glukosa bertujuan untuk membebaskan sumber energi yang tersimpan dalam senyawa tersebut dan dikatalisis oleh enzim (Martoharsono, 1993). Sukrosa merupakan bahan bakar yang dibutuhkan untuk melakukan fermentasi. sebelum dapat masuk ke dalam jalur EMP, sukrosa harus

diubah menjadi D-glukosa dan D-fruktosa oleh bantuan enzim sukrase (Lehninger, 1990).

Menurut Bahar (2008), kristal alga melakukan fermentasi dan menghasilkan metabolisme berupa asam organik dan etanol. Asam organik yang terkandung dalam kristal alga adalah asam piruvat, asam orotat, asam sitrat, asam laktat, dan asam asetat. Asam yang terbentuk dipengaruhi oleh penambahan glukosa. Menurut Fardiaz (1988), berdasarkan perubahan yang terjadi pada karbohidrat sebagai akibat dari aktivitas mikroorganisme, maka produk fermentasi dapat dikelompokkan sebagai proses fermentasi yang mengubah karbohidrat menjadi asam-asam organik, etanol, dan karbondioksida sebagai komponen utama. Perubahan glukosa menjadi asam laktat atau etanol berlangsung dalam beberapa tahap yang masing-masing tahapnya dikatalisis oleh enzim. Jalur glikolisis dan fermentasi etanol itu disusun oleh Embden, Meyerhof dan Parnas, yang kemudian dikenal sebagai jalur EMP (Martoharsono, 1993). Lintasan Glikolisis (Gambar 3) merupakan lintasan yang umum terjadi pada proses fermentasi (Purwoko, 2007).

Tahap pertama fermentasi asam laktat yaitu glukosa akan dipecah menjadi asam piruvat yang disebut Glikolisis glukosa melalui Jalur Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Purwoko, 2007). 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 (Lehninger, 1990).



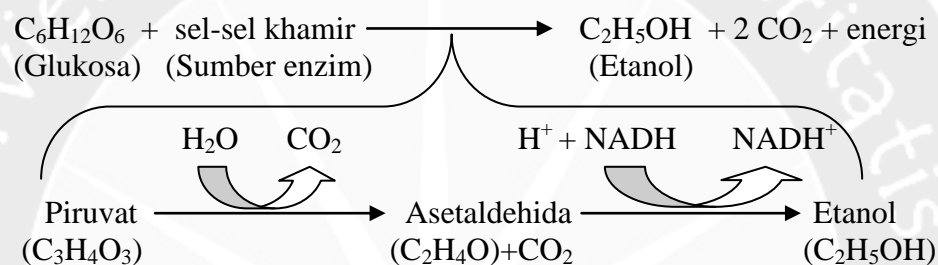


Gambar 3. Lintasan Glikolisis Anaerobik (Sumber : Lehninger, 1990)

Keterangan : Lintasan glikolisis memiliki 2 fase, yaitu fase pertama (1) fosforilasi glukosa dan pengubahnya menjadi gliseraldehida 3-fosfat dan fase kedua (2) perubahan gliseraldehida 3-fosfat menjadi laktat dan pembentukan ATP yang terjadi secara bersamaan.

Tahap kedua fermentasi etanol yaitu proses asam piruvat akan diubah menjadi etanol (Fardiaz, 1988). Fermentasi etanol merupakan proses serupa dengan glikolisis namun piruvat diubah menjadi etanol melalui asetaldehida dengan bantuan enzim piruvat dekarboksilase dan etanol dehidrogenase (Lehninger, 1990). Khamir yang berperan melakukan fermentasi etanol, seperti *Saccharomyces cereviceae* menghasilkan etil etanol (etanol) dan  $\text{CO}_2$  melalui reaksi seperti pada Gambar 4 (Puspaningsih, 2009). Proses fermentasi etanol berbeda dari glikolisis (pada tahap akhir), karena khamir tidak mengandung

dehidrogenase laktat, terjadi 2 reaksi sebagai gantinya yaitu piruvat dekarboksilase dan etanol dehidrogenase (Lehninger, 1990). Piruvat sebanyak 2 mol juga dihasilkan dalam tahap ini. Tahap ketiga adalah piruvat oleh enzim piruvat dekarboksilase diubah menjadi asetaldehida, lalu asetaldehida tereduksi menjadi etanol, dengan NADH yang diberikan dari dehidrogenasi gliseraldehida 3-fosfat, yang menghasilkan tenaga pereduksi melalui kerja enzim etanol dehidrogenase.



Gambar 4 . Proses Fermentasi Etanol pada Kristal Alga oleh Khamir (Sumber : Puspansih, 2009 dan Lehninger, 1990)

Keterangan : proses hasil fermentasi kristal alga terbentuk dalam proses lintasan glikolisis, dari bahan baku glukosa sebagai substrat menjadi etanol, 2 mol karbon dioksida dan energi.

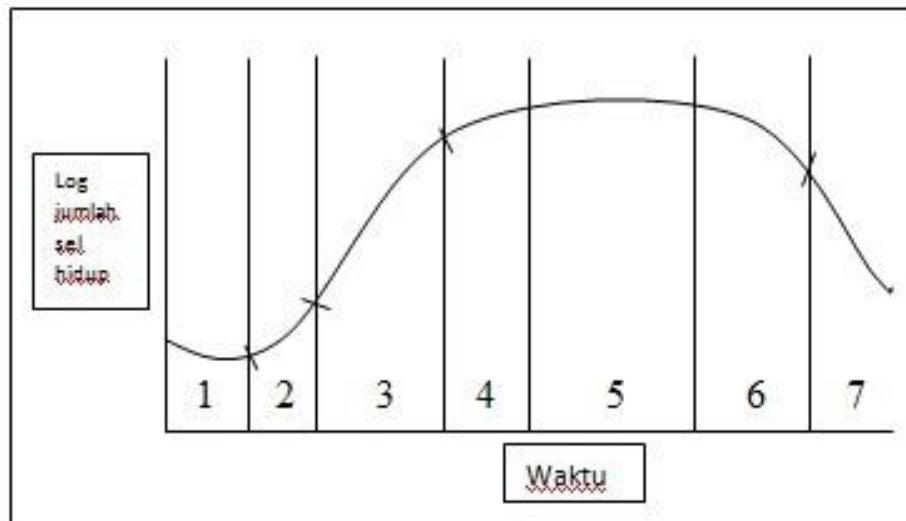
Menurut Madigan dkk. (2000), fermentasi gula menjadi etanol umumnya dilakukan oleh khamir. Khamir yang penting dalam proses fermentasi etanol adalah *Saccharomyces cereviceae* dengan menggunakan gula-gula sederhana seperti glukosa, maltosa, sukrosa, dan rafinosa. Produksi etanol dari glukosa oleh khamir terjadi melalui jalur Glikolisis yang menjadi 3 tahap. Tahap pertama merupakan tahap perubahan glukosa (C6) menjadi 2 molekul gliseraldehid-3-fosfat (C3) menggunakan ATP. Reaksi oksidasi-reduksi dan pelepasan energi tidak terjadi pada tahap pertama. Kedua reaksi tersebut baru terjadi dalam tahap kedua dan menghasilkan energi berupa ATP (Madigan dkk., 2000). Menurut



mikrobia. Kecepatan pertumbuhan adalah perubahan jumlah sel atau massa per satuan waktu. Seluruh komponen sel selama daur pembelahan sel akan menggandakan diri. Interval untuk pembentukan 2 sel dari 1 sel disebut generasi. Waktu generasi terkadang juga disebut waktu ganda (Fardiaz, 1988). Waktu generasi berbeda-beda diantara organisme. Banyak bakteri memiliki waktu generasi selama 1-3 jam tetapi sebagian organisme memiliki waktu generasi yang cepat selama 10 menit dan sisanya dapat terjadi selama beberapa jam bahkan sehari-hari (Fardiaz, 1988).

Perubahan jumlah sel atau massa per satuan waktu dari suatu mikrobia dapat digambarkan dalam bentuk kurva. Kurva pertumbuhan untuk populasi sel mikrobia dalam sistem *batch* diilustrasikan pada Gambar 6. Kurva pertumbuhan tersebut dibagi menjadi 7 fase yaitu fase adaptasi, fase pertumbuhan awal, fase logaritmik, fase pertumbuhan diperlambat, fase statis, fase menuju kematian, dan fase kematian (Fardiaz, 1988).

Fase lag mengawali fase pertumbuhan eksponensial dan dalam fase ini mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungan barunya. Fase eksponensial merupakan fase pertambahan jumlah dan massa mikroorganisme yang terjadi dengan cepat. Fase stasioner merupakan fase yang terjadi setelah fase eksponensial. Jumlah nutrisi berkurang dan terjadi akumulasi metabolit, contohnya etanol dan asam-asam organik, yang berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Jumlah sel akan mengalami penurunan pada fase kematian (Yousef dan Carlstrom, 2003).



Gambar 6. Kurva Pertumbuhan Kultur Mikrobia (Sumber : Fardiaz, 1988)

Keterangan : Kurva pertumbuhan meliputi fase-fase yaitu (1) fase adaptasi, (2) fase Pertumbuhan awal, (3) fase logaritmik, (4) fase pertumbuhan diperlambat, (5) fase statis, (6) fase menuju kematian dan (7) fase kematian.

Proses fermentasi dipengaruhi oleh beberapa faktor (Purwoko, 2007), antara lain :

1. Jenis substrat : mikroorganismenya membutuhkan suplai makanan sebagai sumber energi dan penyedia unsur kimia dasar (karbon, oksigen, sulfur, fosfor, magnesium dan zat besi) untuk pertumbuhan sel.
2. Jenis mikrobia yang digunakan : mudah dibudidayakan dan tumbuh cepat.
3. Suhu : kisaran suhu optimum untuk pertumbuhan kristal alga adalah  $25^{\circ}\text{C}$ .
4. Waktu : fermentasi umumnya berlangsung selama 30-70 jam tergantung pada suhu fermentasi, pH, dan konsentrasi gula.
5. pH : derajat keasaman medium berpengaruh pada keberlangsungan pertumbuhan kristal alga bekerja optimal pada pH 4-4,5.

## **F. Pengukuran Kadar Etanol**

Menurut Irawan (2013), sel khamir merupakan mikrobia yang bersifat fakultatif anaerob kuat, sehingga apabila medium dalam kondisi aerob maka sel akan melakukan proses metabolisme melalui jalur respirasi dan dalam kondisi anaerob sel akan melakukan fermentasi. Menurut Ramona (1997), kenaikan kadar gula yang tinggi akan mengakibatkan medium menjadi lebih terlarut, sehingga tegangan permukaan medium meningkat dan oksigen sulit larut dalam medium. Laju pembentukan etanol pada awal fermentasi sangat lambat, walaupun penambahan jumlah sel dan penggunaan gula meningkat dengan cepat. Hal itu disebabkan oleh medium fermentasi yang masih mengandung oksigen sehingga sel khamir yang memiliki sifat fakultatif anaerob kuat dan tidak melakukan fermentasi terhadap gula akan tetapi melakukan proses respirasi dengan mengubah gula menjadi air dan karbondioksida (Irawan, 2013).

## **G. Hipotesis**

1. Pertumbuhan optimal kristal alga terdapat pada penambahan 85 gram gula dan 15 gram kismis.
2. Kecepatan pertumbuhan kristal alga 31,8% selama 7 hari.
3. Kadar etanol yang terkandung dalam kristal alga adalah 0,5-0,7% selama 7 hari.