

**PENGARUH LAMA FERMENTASI TERHADAP SIFAT FISIKOKIMIA,
MIKROBIOLOGIS, DAN HEDONIK *WATER KEFIR* BUAH NAGA
MERAH (*Hylocereus polyrhizus*)**

SKRIPSI

Oleh:

ATAR RAHMANI ABDA



**PROGRAM STUDI S-1 TEKNOLOGI PANGAN
FAKULTAS PETERNAKAN DAN PERTANIAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2026**

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kesadaran masyarakat terhadap pentingnya kesehatan yang terus meningkat pada masa kini mendorong terciptanya produk pangan yang tidak hanya memiliki cita rasa yang baik, tetapi juga bermanfaat bagi kesehatan. Salah satu kategori produk yang menjawab kebutuhan tersebut adalah minuman probiotik, yaitu produk pangan yang mengandung mikroorganisme hidup dalam jumlah yang cukup, yang apabila dikonsumsi secara teratur mampu memberikan dampak baik bagi kesehatan melalui perbaikan komposisi dan keseimbangan mikroflora di dalam saluran pencernaan. Kandungan bakteri asam laktat minimal menurut SNI 7552:2009 tentang syarat mutu minuman susu fermentasi adalah 10^6 CFU/mL. Minuman probiotik dapat meningkatkan sistem imun, membantu penyerapan nutrisi, serta menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Wulansari *et al.*, 2022). Seiring dengan tren tersebut, pemanfaatan bahan baku lokal dalam pengembangan minuman probiotik semakin banyak diperhatikan, mengingat potensinya sebagai pilihan minuman yang menyehatkan sekaligus mendukung prinsip keberlanjutan dengan memanfaatkan sumber daya yang tersedia di lingkungan sekitar.

Salah satu minuman kandidat probiotik yang sudah mulai banyak dikenal di Indonesia adalah kefir. Kefir merupakan minuman fermentasi yang terbuat dari *kefir grains* yang mengandung simbiosis mutualisme antara ragi dan bakteri, seperti bakteri asam laktat dan asam asetat (Rizqiati *et al.*, 2023). Jenis kefir yang

umumnya dikenal oleh masyarakat adalah kefir dengan media fermentasi susu. Akan tetapi, munculnya kekhawatiran terkait kondisi intoleransi laktosa yang dialami sebagian masyarakat, serta semakin bertambahnya jumlah individu yang menerapkan pola makan vegetarian, mendorong munculnya kebutuhan akan alternatif minuman probiotik yang tidak berbasis susu. Kondisi ini kemudian membuka peluang bagi pengembangan *water kefir* sebagai minuman fermentasi *non dairy*.

Water kefir merupakan salah satu jenis kefir yang dibuat dengan melakukan fermentasi pada larutan gula atau sari nabati menggunakan *water kefir grains*, memiliki rasa asam, serta mengandung karbon dioksida dan sedikit alkohol (Rizqianti *et al.*, 2023). Kandungan probiotik *water kefir* dapat meningkatkan kesehatan pencernaan dengan menjaga jumlah mikroflora pada usus. *Water kefir* mengandung probiotik yang bermanfaat bagi kesehatan pencernaan dan membantu mempertahankan keseimbangan mikroorganisme dalam usus (Laureys dan Vuyst, 2017). Minuman ini memiliki keunggulan dapat dikonsumsi oleh vegetarian dan penderita *lactose intolerant* karena terbuat dari bahan dasar larutan yang mengandung gula, sehingga dapat menjadi solusi minuman fungsional yang lebih inklusif. *Water kefir* umumnya berbahan dasar larutan air dengan gula, tetapi seiring dengan meningkatnya tren kesadaran hidup sehat dan minuman fungsional, variasi substrat untuk fermentasi *water kefir* juga mulai bertambah macamnya. Buah-buahan merupakan salah satu substrat yang mulai banyak dikembangkan sebagai media fermentasi *water kefir*. Karakteristik *water kefir* dipengaruhi oleh substrat, konsentrasi starter, dan lama fermentasi (Effendi dan Parhusip, 2021).

Salah satu buah yang telah dibudidayakan di Indonesia dan memiliki potensi untuk pengembangan lebih lanjut merupakan buah naga merah. Buah ini berasal dari tanaman jenis kaktus yang dapat tumbuh di daerah iklim tropis. Buah naga merah merupakan sumber karbohidrat alami yang mengandung kadar gula dalam jumlah yang cukup memadai, sehingga berpotensi besar untuk dimanfaatkan sebagai substrat dalam proses fermentasi probiotik. Selain itu, buah naga juga mengandung berbagai vitamin dan mineral, seperti kalsium, natrium, kalium, magnesium, fosfor, zat besi, zinc, vitamin B1, B2, B3, vitamin C, serta vitamin E (Aryanta, 2022). Pemanfaatan buah naga merah dalam pembuatan pangan fungsional masih tergolong terbatas. Oleh karena itu, upaya pengembangan pangan fungsional yang berbasis bahan baku lokal dapat menjadi salah satu langkah strategis dalam mendukung diversifikasi produk pangan sekaligus meningkatkan nilai tambah dari komoditas lokal.

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Insani *et al.* (2018) mengenai total khamir, kadar alkohol, total padatan terlarut dan mutu hedonik *water kefir* buah naga merah dengan konsentrasi sukrosa yang berbeda menunjukkan hasil yang berpengaruh nyata. Namun, penelitian mengenai pengaruh perbedaan lama fermentasi terhadap *water kefir* buah naga merah hingga saat ini belum ditemukan. Lama fermentasi merupakan salah satu variabel proses yang sangat menentukan mutu akhir produk fermentasi karena berpengaruh langsung terhadap perubahan karakteristik (Effendi dan Parhusip, 2021). Waktu fermentasi yang terlalu singkat dapat menghasilkan produk yang belum mencapai karakteristik fisikokimia, mikrobiologis, dan sensori yang diinginkan. Sedangkan, fermentasi yang terlalu

lama dapat menyebabkan penurunan pada mutu produk serta penerimaan panelis. Penelitian mengenai pengaruh lama fermentasi terhadap total bakteri asam laktat, total padatan terlarut, total asam tertitrasi, pH, dan hedonik pada *water kefir* buah naga merah hingga saat ini belum ditemukan. Oleh karena itu, terdapat celah penelitian yang dapat dikaji lebih lanjut untuk mengetahui waktu fermentasi optimal dalam pembuatan water kefir buah naga merah dengan kualitas fisikokimia, mikrobiologis, dan sensoris yang baik sekaligus mendukung pemanfaatan buah naga merah bernilai ekonomi.

1.2. Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama fermentasi yang berbeda terhadap total bakteri asam laktat, total padatan terlarut, total asam tertitrasi, pH, dan hedonik pada *water kefir* buah naga merah. Hasil penelitian diharapkan menjadi acuan dalam optimasi proses fermentasi untuk menghasilkan minuman fermentasi berbasis buah naga merah dengan kualitas fisikokimia, mikrobiologis, dan sensorik yang optimal, sekaligus dapat dijadikan sebagai bahan referensi dalam penelitian atau percobaan selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Water kefir*

Water kefir merupakan minuman fermentasi yang diperoleh dari hasil fermentasi *water kefir grains* dalam larutan yang mengandung gula. Minuman ini semakin populer karena kandungan mikroorganisme hidup dari berbagai spesies bakteri asam laktat, bakteri asam asetat, dan ragi yang bermanfaat bagi kesehatan (Moretti *et al.*, 2022). *Water kefir* dapat dibuat dengan inokulasi *starter* dalam berbagai media karbon seperti larutan gula pasir, jus buah-buahan, atau cairan lain yang mengandung *fermentable sugar*. Media fermentasi *water kefir* dapat berupa larutan gula sederhana ditambah ekstrak buah sebagai nutrisi tambahan, dan durasi fermentasi biasanya antara 24-72 jam pada suhu kamar (Tamang dan Lama, 2022). Keunggulan *water kefir*, di antaranya kadar alkohol yang dihasilkan lebih rendah dan kandungan lemak yang lebih sedikit dibandingkan kefir berbahan dasar susu.

Karakteristik *water kefir* berbeda dengan kefir susu, yaitu sedikit lebih encer, berwarna putih keruh atau tergantung medianya, terdapat sensasi soda, sedikit beralkohol, dan rasa yang asam sedikit manis (Purba *et al.*, 2018). Bibit kefir susu berupa granula kecil dan berwarna putih susu, sedangkan bibit *water kefir* berbentuk granular, lebih padat, dan biasanya berwarna putih keruh atau tidak berwarna (Guzel-Seydim *et al.* 2021). *Water kefir grains* merupakan komunitas simbiotik bakteri dan ragi kompleks yang digunakan untuk memulai fermentasi pada larutan gula. Pendapat Pendón *et al.* (2022) menyebutkan populasi mikroba

pada *starter* meliputi bakteri asam laktat (7–8 log CFU/g *grain*), bakteri asam asetat (6–7 log CFU/g *grain*), serta ragi (6–7 log CFU/g *grain*). *Grains* utamanya terdiri dari polisakarida ekstraseluler dekstran, yang menyediakan keutuhan struktural dan memungkinkan perpindahan komunitas mikroba di dalamnya dari suatu fermentasi ke fermentasi berikutnya. *Grains* mampu beradaptasi dengan beragam bahan baku pangan, sehingga memungkinkan untuk memproduksinya menjadi berbagai jenis minuman fermentasi dengan karakteristik khas (Rocha-Gomes *et al.*, 2018).



Ilustrasi 1. *Water kefir grains*
Sumber: Matejčková dan Valík (2025)

Jenis strain bakteri yang terkandung dalam *water kefir grains* dapat bervariasi. Dalam penelitian ini, *starter* yang digunakan mengandung beberapa bakteri dan ragi dominan, di antaranya *L. casei/paracasei*, *L. harbinensis*, *L. hilgardii*, *Bifidobacterium spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, dan *Dekkera bruxellensis*. Pendapat Kaya *et al.* (2025) menyatakan mikroorganisme utama dalam proses fermentasi kefir air adalah *L. hilgardii*, *L. nagelii*, *Lacticaseibacillus paracasei*, dan *Saccharomyces cerevisiae* (ragi). Ragi akan menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa serta menjadi produsen utama etanol dan ester volatil (Matejčková dan Valík, 2025). BAL adalah penghasil utama asam laktat, sedangkan BAA menghasilkan berbagai asam organik, seperti asam asetat dan asam

glukonat, yang merupakan hasil dari metabolisme etanol. Proses fermentasi ini menghasilkan produk dengan kandungan asam laktat, asam asetat, etanol, CO₂ dan senyawa organik lainnya yang memberikan cita rasa khas fermentasi dan sensasi *sparkling* serta memperpanjang umur simpan minuman (Sin *et al.*, 2024).

2.2. Mutu *Water kefir*

Water kefir dapat disebut sebagai produk olahan probiotik berbasis *non dairy product* yang masih baru, sehingga belum ada standar mutu spesifik tersendiri yang mengatur syarat mutunya. Umumnya proses produksi *water kefir* masih mengacu pada syarat mutu produk minuman fermentasi lain yang berbasis *dairy product*, seperti yoghurt dan kefir. Syarat mutu minuman susu fermentasi yang bahan bakunya dari kefir dan kumys dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Syarat Mutu Minuman Susu Fermentasi menurut SNI 7552-2018

No.	Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Warna	-	normal
1.2	Bau	-	normal
1.3	Rasa	-	normal
2	Protein (N x 6,38)	fraksi massa, %	min.1,0
3	Kultur bakteri	koloni/ml	min. 1,0 x 10 ⁶
4	Kultur khamir	koloni/ml	min. 1,0 x 10 ⁴
5	Cemaran logam		
5.1	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,02
5.2	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,05
5.3	Timah (Sn)	mg/kg	maks. 40
5.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,02
6	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,10

Sumber: Badan Standar Nasional, 2018.

2.3. Buah Naga Merah

Buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) merupakan buah yang dihasilkan oleh tanaman jenis kaktus yang biasa ditemukan di daerah tropis. Buah naga berasal dari Amerika Tengah dan Amerika Selatan bagian utara, tetapi telah lama dibudidayakan di Indonesia (Syarifudin *et al.*, 2023). Buah ini kaya akan kandungan gula alami, vitamin, dan senyawa bioaktif yang berpotensi memberikan manfaat kesehatan bagi manusia (Susanty dan Sampepana, 2017). Akan tetapi, pemanfaatan buah naga merah di Indonesia secara komersil masih terbatas. Salah satu pemanfaatan buah naga merah yang dapat dilakukan adalah dengan menjadikan buah naga merah sebagai media fermentasi *water kefir*. Sari buah naga merah yang diperoleh dengan cara memblender daging buah yang telah dikupas dan disaring mengandung berbagai monosakarida seperti glukosa dan fruktosa, juga sukrosa, yang menjadi sumber karbon penting dalam media fermentasi (Surja *et al.*, 2019). Kandungan gizi buah naga merah dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kandungan Gizi Buah Naga Merah per 100 gram

No.	Kandungan Gizi	Berat	Satuan
1	Karbohidrat	5,97	g
2	Glukosa	1,33	g
3	Fruktosa	2,00	g
4	Sukrosa	2,54	g
5	Protein	0,89	g
6	Lemak	0,57	g
7	Serat	1,01	g
8	Kalsium	31,20	mg
9	Fosfor	29,20	mg
10	Zat Besi	0,78	mg
11	Vitamin C	3,40	mg
12	Air	85,70	ml
13	Energi	71,00	kkal

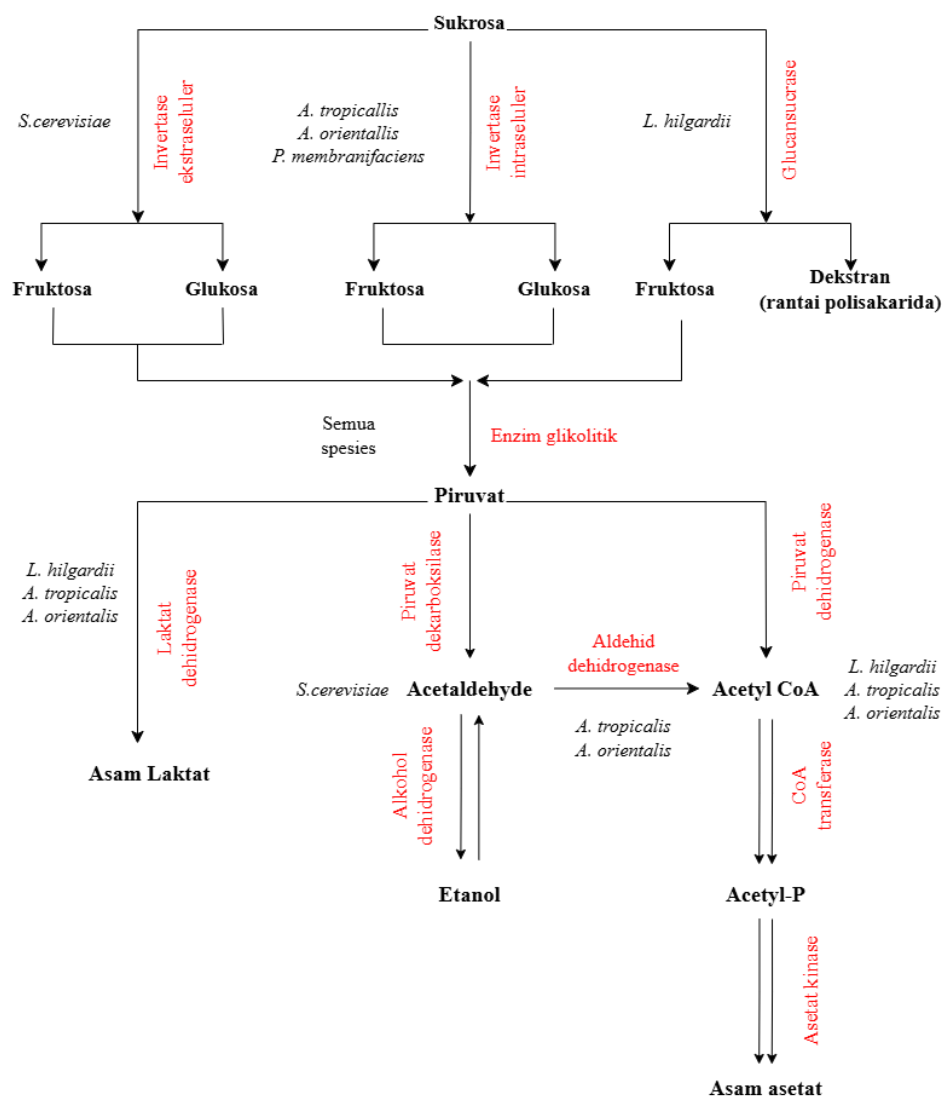
Sumber: Shah *et al.*, (2023)

2.4. Fermentasi

Fermentasi merupakan proses metabolisme anaerobik yang terjadi akibat mikroorganisme, seperti bakteri asam laktat (BAL), bakteri asam asetat (BAA) dan ragi, mengubah bahan organik menjadi produk hasil, seperti asam organik, gas, atau alkohol. Proses ini merupakan metode pengawetan makanan dan minuman yang telah diterapkan sejak lama sekaligus memberikan manfaat kesehatan melalui produksi mikroba probiotik (Rizqianti *et al.*, 2021). Fermentasi juga meningkatkan nilai gizi dan keamanan pangan dengan meningkatkan ketersediaan nutrisi dan menurunkan patogen (Cufaoglu dan Erdinc, 2023). Fermentasi dengan starter khusus seperti *kefir grains* mulai banyak diamati karena mampu menghasilkan produk dengan karakteristik sensori dan bioaktif yang unik. Fermentasi *water kefir* berlangsung dengan bakteri yang mengurai karbon dalam gula dan mengubahnya menjadi asam laktat, etanol, dan senyawa aromatik, menghasilkan minuman yang menyegarkan berwarna sedikit keruh dan bersoda alami (Köhler *et al.*, 2021).

Ragi termasuk salah satu mikroba yang krusial dalam fermentasi *water kefir*. Pertumbuhan mikroorganisme terjadi akibat reaksi enzimatik dari enzim invertase, yang dapat meningkatkan kadar gula reduksi dari perombakan gula non reduksi. Glukosa dan fruktosa hasil perombakan ragi dapat digunakan oleh BAL homofermentatif untuk dimetabolisme menjadi asam laktat melalui proses glikolisis. BAL heterofermentatif menggunakan enzim fosfoketolase dalam proses metabolismenya, sehingga menghasilkan asam asetat, etanol, dan CO₂ sebagai produk akhirnya. Selain itu, enzim glukanasukrase pada BAL secara enzimatik mengubah sukrosa menjadi eksopolisakarida (EPS) dekstran, yang meningkatkan

volume *grains* selama proses fermentasi (Adya *et al.*, 2025). Ragi juga melakukan fermentasi alkohol yang mengurai glukosa menjadi etanol dan CO₂, yang kemudian etanol tersebut dapat dirombak oleh BAA menjadi asam asetat. Keseimbangan antara mikroba menentukan karakteristik akhir produk, sehingga kondisi lingkungan, seperti kadar substrat, pH, dan suhu perlu dikendalikan dengan baik.



Ilustrasi 2. Diagram Alir Fermentasi Alkohol, Asam Laktat, dan Asam Asetat pada *Water Kefir*
Sumber: Martinez-Torres *et al.* (2017)

2.5. Parameter Pengujian

Parameter yang digunakan untuk menentukan mutu pada *water kefir* buah naga merah, yaitu total padatan terlarut, pH, total asam, total bakteri asam laktat (BAL), dan hedonik.

2.5.1. Total bakteri asam laktat

Perhitungan total bakteri asam laktat (BAL) dilakukan dengan mengisolasi BAL menggunakan media isolasi yang spesifik. Media selektif dirancang untuk mendukung pertumbuhan dan mempertahankan mikroba tertentu dengan karakter spesifiknya sehingga secara otomatis terisolasi (Putri dan Kusdiyantini, 2018). Isolasi dilakukan menggunakan media *de Mann Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), yaitu media selektif yang digunakan sebagai media isolasi BAL. Media MRSA diformulasikan untuk memfasilitasi pertumbuhan bakteri asam laktat, seperti genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* (Putri dan Kusdiyantini, 2018). Bakteri yang terdapat pada media MRSA diinokulasi dengan cawan petri yang ditutup dan diinkubasi pada suhu sekitar 37°C selama 24 jam (Syabinar *et al.*, 2017). Karakteristik bakteri yang tumbuh akan diamati morfologinya melalui uji makroskopik dengan mengamati ciri koloni (bentuk, warna, tepian, dan elevasi). Jumlah koloni yang akan digunakan sebagai perhitungan total BAL yaitu koloni yang berjumlah antara 30-300 dan dengan satuan perhitungan CFU/mL.

2.5.2. Total padatan terlarut

Analisis pengujian total padatan terlarut merupakan ukuran dari jumlah material yang dilarutkan dalam air. Total padatan terlarut pada dasarnya meliputi gula reduksi, gula non reduksi, senyawa asam organik, pektin, dan protein yang terlarut pada suatu bahan (Basuki dan Nuraini, 2019). Semakin tinggi konsentrasi penstabil yang terkandung dalam produk, maka semakin tinggi total padatan terlarutnya. Total padatan terlarut dapat diukur dengan menggunakan alat *hand refractometer*. Refraktometer merupakan alat ukur yang digunakan untuk menentukan konsentrasi bahan atau zat terlarut yang diukur dalam satuan °Brix, merepresentasikan 1 g sukrosa dalam 100 g larutan. Refraktometer bekerja dengan metode memanfaatkan teori refraksi cahaya (Cahyadi *et al.* 2018). Refraktometer memiliki prinsip kerja sampel diteteskan 2-3 tetes di atas prisma kemudian menggunakan cahaya polikromatis dari sinar lampu untuk mengetahui hasil.

2.5.3. Total asam tertitrasi

Total asam tertitrasi menunjukkan jumlah konsentrasi asam yang terdapat pada suatu produk. Perhitungan total asam pada kefir didasarkan pada kandungan asam laktat, yang merupakan hasil metabolit primer fermentasi yang diproduksi dari pemecahan glukosa pada substrat oleh bakteri asam laktat. Parameter ini dapat menggambarkan perkembangan proses fermentasi produk. Metode titrasi asam merupakan salah satu metode perhitungan total asam yang menghitung total asam tertitrasi. Total asam tertitrasi dihitung sebagai total volume NaOH yang dibutuhkan dalam menetralkan asam dalam 100 g produk (Saputra *et al.*, 2022).

2.5.4. pH

pH merupakan salah satu parameter krusial dalam proses fermentasi, termasuk fermentasi *water kefir* dari buah naga merah. Nilai pH mengukur tingkat keasaman atau kebasaan larutan, serta merupakan indikator utama kemajuan fermentasi. Dalam fermentasi *water kefir*, pH awal biasanya berkisar antara 5,0 hingga 6,0, kemudian mengalami penurunan signifikan seiring dengan berlangsungnya fermentasi menjadi kisaran 3,5 sampai 4,5 setelah 48 hingga 72 jam fermentasi (Lynch *et al.*, 2021). Penurunan pH menunjukkan aktivitas metabolik mikroba yang mengubah gula dalam sari buah menjadi asam laktat, asam asetat, dan alkohol sehingga proses fermentasi menghasilkan produk yang lebih asam dan stabil secara mikrobiologi. Variasi pH produk dipengaruhi oleh jenis buah, konsentrasi starter, suhu fermentasi, dan waktu fermentasi yang diterapkan.

2.5.5. Mutu Hedonik

Mutu hedonik merupakan mutu sensori yang selalu diperhatikan dalam memproduksi suatu produk. Mutu ini ditentukan dengan uji hedonik, yaitu metode evaluasi sensori yang digunakan untuk mengukur tingkat kesukaan panelis terhadap suatu produk, khususnya dalam aspek sensorinya. Uji hedonik sangat penting dalam pengembangan produk baru untuk memahami bagaimana atribut sensoris produk diterima di pasar (Rizqianti *et al.*, 2021). Dalam konteks *water kefir*, uji hedonik digunakan untuk menilai profil sensori yang meliputi aroma, rasa, sensasi soda, serta penilaian keseluruhan yang mencerminkan kepuasan konsumen terhadap

produk fermentasi ini (Tamang dan Lama, 2022). Aroma *water kefir* biasanya dinilai berdasarkan intensitas dari aroma asam atau khas fermentasi produk, sementara rasa melibatkan tingkat kemanisan, keasaman, dan keunikan rasa fermentasi. Atribut aroma berperan krusial terhadap persepsi kesegaran dan kualitas produk kefir, yang dihasilkan oleh senyawa volatil selama fermentasi (Bozkir *et al.*, 2024). Sensasi soda merupakan atribut yang perlu diperhatikan karena dapat menjadi salah satu faktor penentu dari keberhasilan fermentasi. Penilaian keseluruhan menggabungkan aspek-aspek ini dan memberikan indikator penerimaan produk *water kefir* di pasar yang bisa digunakan untuk perbaikan produk selanjutnya (Sin *et al.*, 2024).

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2025 – Februari 2026 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan serta Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang. Uraian penelitian dimulai dari pembuatan dan preparasi sampel, pengujian total bakteri asam laktat, total padatan terlarut, total asam tertitrasi, nilai pH, dan uji hedonik.

3.1. Materi Penelitian

Materi yang digunakan pada penelitian ini terdiri atas buah naga merah, aquades, *water kefir grains* (Kefiree), gula pasir (Gulaku), media *de Man Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA Merck), indikator fenolftalein, larutan NaOH 0,1 N dan larutan NaCl fisiologis 0,85%, , alkohol 70%, dan spirtus.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini, di antaranya yaitu mikropipet, tip mikropipet, pipet tetes, refraktometer (Atago), pH meter (Ohaus), cawan petri *disposable* (OneMed), *centrifuge tube*, gelas ukur, labu erlenmeyer, gelas *beaker*, inkubator (B-One), *autoclave* (Hirayama), *laminar air flow* (Airtech), bunsen, *hotplate* (B-One) dan *magnetic stirrer*, kompor, baskom *stainless steel*, timbangan analitik (Shimadzu), *vortex mixer* (Thermolyne), buret, statif dan klem, pisau, sendok, panci, jar kaca hermetico, blender (Phillips), *colony counter* (J-2), siever

100 mesh, termometer, *heat gun*, serta kertas dan cup plastik 50 ml untuk uji hedonik.

3.2. Metode Penelitian

Metode penelitian meliputi rancangan penelitian, prosedur penelitian, pengujian parameter, pengujian parameter, dan analisis data yang diperoleh dari penelitian. Metode penelitian tersebut diuraikan secara rinci sebagai berikut.

3.2.1. Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dengan 4 kali ulangan sehingga didapatkan 20 unit percobaan. Perlakuan yang diterapkan yaitu lama waktu fermentasi yang bervariasi, yaitu 0 jam (P_0), 12 jam (P_1), 24 jam (P_2), 36 jam (P_3), dan 48 jam (P_4). Variasi perlakuan lama fermentasi dan ulangan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Desain Percobaan Kombinasi Perlakuan dan Ulangan

Ulangan (U)	Perlakuan Lama Fermentasi				
	P_0	P_1	P_2	P_3	P_4
1	P_0U_1	P_1U_1	P_2U_1	P_3U_1	P_4U_1
2	P_0U_2	P_1U_2	P_2U_2	P_3U_2	P_4U_2
3	P_0U_3	P_1U_3	P_2U_3	P_3U_3	P_4U_3
4	P_0U_4	P_1U_4	P_2U_4	P_3U_4	P_4U_4

Keterangan:

P_0 : Lama fermentasi 0 jam

P_1 : Lama fermentasi 12 jam

P_2 : Lama fermentasi 24 jam

P_3 : Lama fermentasi 36 jam

P_4 : Lama fermentasi 48 jam

Adapun susunan hipotesis yang digunakan pada pengujian ini adalah sebagai berikut:

H_0 : Tidak terdapat pengaruh perbedaan lama waktu fermentasi terhadap total padatan terlarut, pH, total asam tertitrasi, total bakteri asam laktat, dan hedonik.

H_1 : Sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh perbedaan lama waktu fermentasi terhadap total padatan terlarut, pH, total asam tertitrasi, total bakteri asam laktat, dan hedonik.

Model linear aditif rancangan percobaan yang diterapkan adalah:

$$Y_{mn} = \mu + \pi_m + \sum_{mn}$$

Keterangan:

Y_{mn} : produksi *water kefir* dengan ulangan ke-n (1,2,3,4) yang memperoleh perlakuan lama fermentasi ke-m (P_0, P_1, P_2, P_3, P_4)

μ : nilai tengah produksi populasi *water kefir*

π_m : pengaruh dari perlakuan ke-m

$\sum_{mn}$: pengaruh galat lama fermentasi ke-m pada *water kefir* ke-n yang memperoleh perlakuan lama fermentasi

Secara statistik, hipotesis empirik di atas dapat dijabarkan sebagai berikut:

H_0 : $\mu_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$

H_1 : $\mu_0 \neq \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$ atau setidaknya terdapat satu pengaruh perlakuan

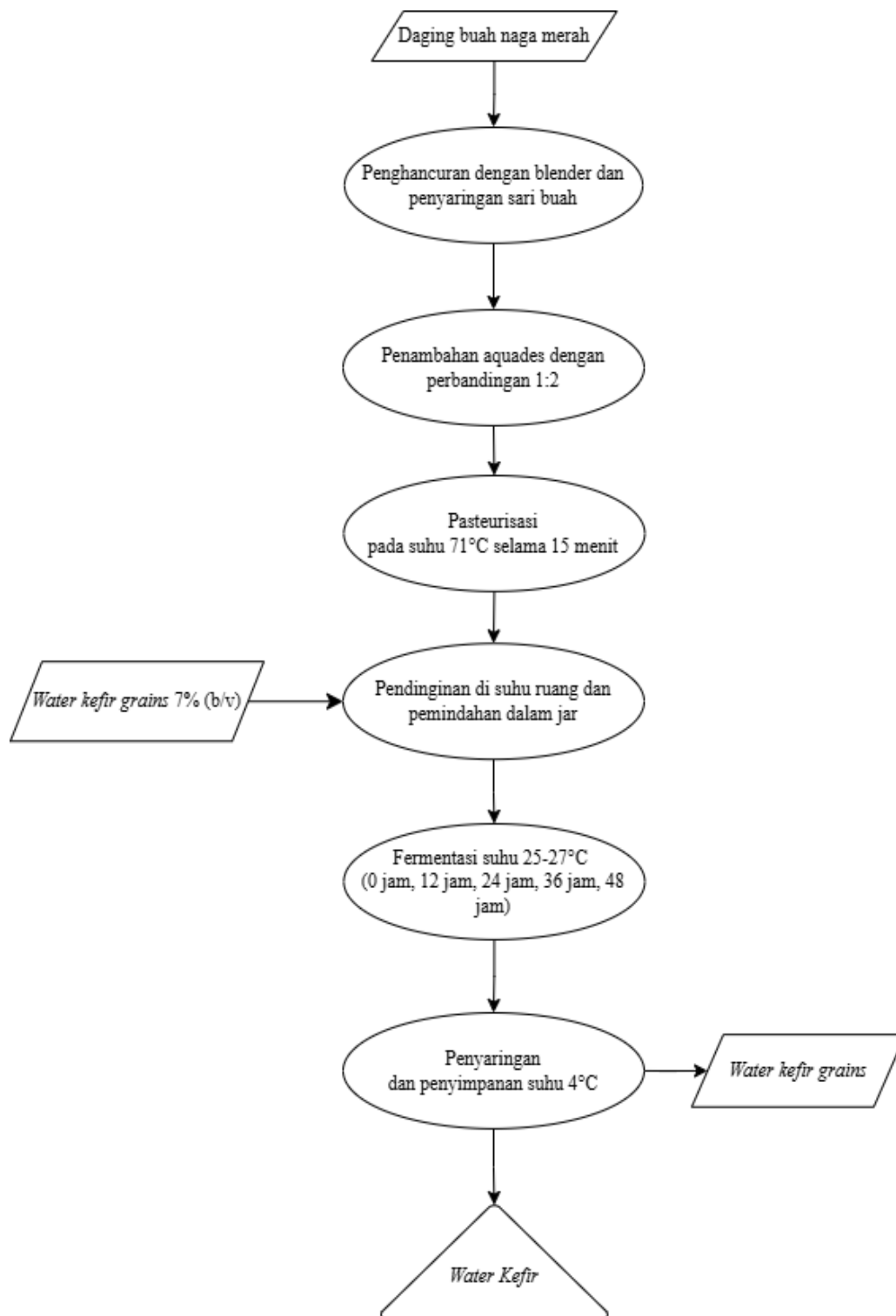
Kriteria pengujian analisis statistik yang digunakan adalah sebagai berikut:

$\text{Sig} \geq 0,05$, maka H_0 diterima dan H_1 ditolak

$\text{Sig} < 0,05$, maka H_1 diterima dan H_0 ditolak

3.2.2. Prosedur penelitian

Pembuatan *water kefir* dilakukan berdasarkan modifikasi metode penelitian oleh Mulyani *et al.* (2021). Pembuatan *water kefir* diawali dengan buah naga merah disortir untuk menyeleksi kualitas terbaik, lalu buah naga merah dicuci, dikupas kulitnya, dan dipotong. Kemudian daging buah naga merah dihancurkan menggunakan *blender*, sarinya disaring dengan saringan mesh 100, dan ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:2, serta sukrosa 3%. Selanjutnya buah naga merah dipasteurisasi dengan metode *double boiling* pada suhu 71°C selama 15 menit dan didinginkan hingga mencapai suhu ruang. Tahap selanjutnya adalah buah naga merah diinokulasi dengan penambahan *water kefir grains* sebanyak 7% dari total volume dan diaduk secara perlahan hingga merata. Kemudian dilakukan fermentasi dengan jar kaca ditutup sesuai perlakuan lama fermentasi, yaitu selama 0 jam (P0), 12 jam (P1), 24 jam (P2), 36 jam (P3), dan 48 jam (P4) dengan suhu yang sama, yaitu suhu ruang (25-27°C). Pemilihan interval waktu fermentasi 12 jam didasarkan dari mayoritas metode pada penelitian karena memungkinkan untuk menangkap dinamika perubahan produk secara lebih rinci dan menggambarkan tren dari pengaruh lama fermentasi terhadap parameter yang akan diamati. Suhu ruang merupakan rentang suhu yang cukup bagi seluruh jenis mikroorganisme dalam *grains* untuk tumbuh dan menghindari perubahan karakteristik fisikokimia dari substrat. *Water kefir* disaring dengan saringan untuk memisahkan *water kefir grains* dan produk siap untuk diuji.



Ilustrasi 3. Diagram alir pembuatan *water kefir* buah naga merah

3.2.3. Pengujian parameter

Pengujian parameter yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji total padatan terlarut, uji pH, uji total asam tertitrasi, uji total bakteri asam laktat, dan uji hedonik. Metode pengujian yang dilakukan terhadap tiap parameter diuraikan sebagai berikut.

a. Total bakteri asam laktat

Proses pengujian total bakteri asam laktat (BAL) mengacu pada Mulyani *et al.* (2021) yang dilakukan dengan metode *pour plate* dan perhitungan *selective count*. Prosedur dimulai dengan penambahan 1 ml sampel setiap perlakuan ke 9 ml larutan NaCl fisiologis 0,85% untuk pengenceran awal, lalu dilanjutkan hingga mencapai pengenceran 10^{-5} . Tiga seri pengenceran terakhir masing-masing diambil 1 ml untuk *plating* secara duplo. Suspensi dituang ke dalam cawan petri dan ditambahkan dengan 15 ml MRS Agar, lalu diratakan dengan pemutar cawan membentuk angka delapan. Cawan dengan medium yang telah memadat diinkubasi dalam posisi terbalik pada inkubator dengan suhu 37°C selama 48 jam. Jumlah koloni dihitung pada cawan petri yang memiliki jumlah koloni sebanyak 30-300 koloni. Total BAL dinyatakan dalam log CFU/mL dan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah BAL} \frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{pengenceran}}$$

b. Total padatan terlarut

Proses pengujian total padatan terlarut (TPT) merujuk pada penelitian Insani *et al.* (2018) yang dilakukan dengan alat refraktometer digital. Proses pengujian

total padatan terlarut diawali dengan kalibrasi alat, yaitu dibilas dengan aquades hingga *display* menunjukkan angka 0,0 dan diseka dengan tisu. Selanjutnya sampel diambil dengan pipet tetes dan diteteskan pada prisma, lalu hasil dapat langsung dicatat. Jumlah kandungan padatan terlarut dinyatakan dalam satuan °Brix. Nilai indeks bias yang tinggi menunjukkan padatan terlarut yang tinggi pada larutan.

c. Total asam

Pengujian total asam dilakukan berdasarkan pada penelitian Rohman *et al.* (2019) dengan metode titrasi asam yang dinyatakan sebagai persentase asam laktat. Pengujian diawali dengan sampel *water kefir* buah naga merah diambil sebanyak 5 ml, diencerkan menjadi 25 ml, dan dituang ke dalam labu erlenmeyer. Indikator *phenolphthalein* (PP) 1% ditambahkan sebanyak 2 tetes, lalu dilakukan titrasi sampel dengan larutan NaOH 0,1 N hingga terjadi perubahan warna dari merah muda menjadi ungu pekat. Volume NaOH yang diperlukan hingga mencapai titik akhir dicatat. Total asam yang tertitrasi dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Total asam tertitrasi (\%)} = \frac{\text{mL NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{BM} \times \text{FP}}{\text{mL sampel} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

N NaOH = 0,1 N

BM Asam Laktat = 90,08 g/mol

d. pH

Metode pengujian pH dilakukan berdasarkan penelitian Rizqianti *et al.* (2021) dengan alat pH meter. Proses pengujian pH diawali dengan kalibrasi elektroda pH meter dalam larutan buffer dengan pH 4. Kemudian elektroda dimasukkan ke dalam

sampel dan ditunggu hingga tampilan instrumen memberikan angka konstan dan nilai pH sampel dapat dibaca. Semakin kecil nilai pH maka semakin bersifat asam.

e. Uji hedonik

Pengujian hedonik sebagaimana dijelaskan oleh Cahyani *et al.* (2019) dilakukan dengan menggunakan skala kesukaan terhadap *water kefir* buah naga merah. Sebanyak 25 panelis tidak terlatih akan disajikan 25 ml sampel perlakuan P0, P1, P2, P3, dan P4 yang telah diberi label angka 3 digit acak. Kemudian panelis akan diminta untuk mencicipi dan menilai sampel pada kuesioner. Penilaian dilakukan berdasarkan tingkat kesukaannya terhadap setiap atribut sensoris sampel, yaitu aroma, rasa, sensasi soda dan *overall* dengan 5 skala hedonik. Kriteria panelis dapat dilihat pada lampiran 16.

3.2.4. Analisis Data

Pengolahan data parametrik yang terdiri dari uji total padatan terlarut, nilai pH, total asam tertitrasi, dan total bakteri asam laktat *water kefir* buah naga merah dilakukan dengan analisis statistik *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf signifikansi 5% untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan dan diteruskan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) apabila terdapat pengaruh signifikan. Pengolahan data non parametrik untuk hasil pengujian hedonik dianalisis dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* dengan taraf signifikansi 5% dan hasil analisis yang terdapat pengaruh nyata terhadap perlakuan akan dilanjutkan pengujian dengan metode uji *Mann-Whitney*. Analisis data dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS 26.0 *for Windows*.