

Determination of Ethanol and Lactic Acid Content from Goat Milk Kefir Fermentation

Penentuan Kadar Etanol Dan Asam Laktat Dari Hasil Fermentasi Susu Kefir Kambing

Annisa Utami ^a, Anny Sartika Daulay ^{a*}, Ridwanto ^a, Ainil Fithri Pulungan ^a

^a Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah, Medan, Sumatera Utara, Indonesia.

*Corresponding Authors: annysartika@umnaw.ac.id

Abstract

Goat-milk kefir contains lactic acid and ethanol formed through the symbiotic metabolism of lactic acid bacteria and yeasts; however, information on their changes during prolonged fermentation remains limited. This study aimed to characterize ethanol accumulation during six days of goat-milk kefir fermentation and to determine lactic acid after 24 h. Goat milk (250 mL) was heated at 75 °C, inoculated with 4% (w/v) kefir grains, and fermented at 25 ± 2 °C. Ethanol was screened using iodoform, acidified potassium dichromate, and esterification reactions, followed by visible spectrophotometric quantification at 443 nm after Conway microdiffusion. Lactic acid was quantified using HPLC-UV at 210 nm with 50 mM phosphate buffer (pH 2.8), a flow rate of 1 mL/min, and an injection volume of 20 µL. The pH decreased from 4.19 on day 1 to 2.15 on day 6, while ethanol increased from 0.227 to 0.657 g/dL ($p < 0.001$). Commercial kefir contained 0.453 g/dL ethanol. The ethanol and lactic-acid calibration models showed R^2 values of 0.996; lactic acid in 24-h kefir was 3.923%. Prolonged fermentation therefore produced progressive acidification accompanied by ethanol accumulation, with the greatest change occurring during the first three days. These findings establish fermentation time as an important determinant of the metabolite profile of goat-milk kefir and provide a basis for subsequent studies using independent fermentation batches and fully validated analytical methods.

Keywords: goat milk; kefir fermentation; fermentation time; ethanol; lactic acid; UV-Vis spectrophotometry; HPLC

Abstrak

Kefir susu kambing mengandung asam laktat dan etanol yang terbentuk melalui metabolisme simbiotik bakteri asam laktat dan khamir; namun, informasi mengenai perubahannya selama fermentasi berkepanjangan masih terbatas. Penelitian ini bertujuan mengarakterisasi akumulasi etanol selama enam hari fermentasi kefir susu kambing dan menentukan kadar asam laktat setelah 24 jam. Susu kambing (250 mL) dipanaskan pada 75 °C, diinokulasi dengan grain kefir 4% (b/v), dan difermentasi pada 25 ± 2 °C. Etanol diskriminasi menggunakan reaksi iodoform, kalium dikromat dalam suasana asam, dan esterifikasi, kemudian ditetapkan dengan spektrofotometri sinar tampak pada 443 nm setelah mikrodifusi Conway. Asam laktat ditetapkan menggunakan HPLC-UV pada 210 nm dengan buffer fosfat 50 mM (pH 2,8), laju alir 1 mL/menit, dan volume injeksi 20 µL. Nilai pH menurun dari 4,19 pada hari pertama menjadi 2,15 pada hari keenam, sedangkan kadar etanol meningkat dari 0,227 menjadi 0,657 g/dL ($p < 0,001$). Kefir komersial mengandung etanol 0,453 g/dL. Model kalibrasi etanol dan asam laktat masing-masing menghasilkan R^2 0,996; kadar asam laktat kefir 24 jam sebesar 3,923%. Fermentasi berkepanjangan dengan demikian menyebabkan pengasaman progresif yang disertai akumulasi etanol, dengan perubahan terbesar berlangsung selama tiga hari pertama. Temuan ini menegaskan waktu fermentasi sebagai determinan penting profil metabolit kefir susu kambing dan menjadi dasar bagi penelitian lanjutan menggunakan batch fermentasi independen serta metode analitik yang tervalidasi secara lengkap.

Kata kunci: susu kambing; fermentasi kefir; waktu fermentasi; etanol; asam laktat; spektrofotometri UV-Vis; HPLC



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v9i3.1812>

Article History:

Received: 13/06/2026,
Revised: 13/08/2026,
Accepted: 14/08/2026,
Available Online: 15/08/2026.

QR access this Article



Pendahuluan

Kefir merupakan minuman susu fermentasi yang dibentuk oleh komunitas kompleks bakteri asam laktat, bakteri asam asetat, dan khamir di dalam grain kefir. Interaksi tersebut mengonversi laktosa dan komponen susu menjadi asam organik, etanol, karbon dioksida, peptida, dan senyawa volatil yang menentukan keasaman, aroma, tekstur, serta stabilitas produk [1–4]. Susu kambing sesuai digunakan sebagai substrat karena komposisi protein, lemak, mineral, dan karakter globula lemaknya mendukung pengembangan produk fermentasi dengan sifat sensori dan fungsional yang khas [5–7].

Waktu dan suhu fermentasi merupakan pengendali penting komposisi metabolit kefir. Pada fase awal, bakteri asam laktat menurunkan pH melalui pembentukan laktat; selanjutnya khamir memanfaatkan gula yang tersedia dan menghasilkan etanol serta CO₂. Aktivitas kedua kelompok mikroba dipengaruhi oleh suhu, jumlah dan komposisi grain, ketersediaan substrat, oksigen, serta akumulasi produk metabolik [2,4,8–11]. Penelitian metabolomik terkini pada kefir susu kambing juga menunjukkan bahwa perlakuan panas dan lama fermentasi mengubah profil asam organik, gula, asam amino, dan metabolit volatil secara nyata [3].

Perubahan biokimia selama fermentasi kefir bersifat dinamis dan tidak hanya ditentukan oleh satu kelompok mikroorganisme. Bakteri asam laktat mengonversi laktosa menjadi laktat sehingga pH menurun dan kasein mengalami koagulasi, sedangkan khamir membentuk etanol dan CO₂ melalui metabolisme gula. Interaksi tersebut turut memengaruhi pembentukan asetaldehida, diasetil, asam asetat, peptida, dan eksopolisakarida yang menentukan aroma, rasa, viskositas, serta stabilitas kefir [2,8–10]. Analisis metabolomik pada kefir susu kambing memperlihatkan bahwa lama fermentasi dan perlakuan panas mengubah profil gula, asam organik, asam amino, serta metabolit volatil, sehingga waktu fermentasi merupakan variabel proses yang secara langsung menentukan karakter produk [3].

Komposisi susu kambing memberikan konteks khusus terhadap proses tersebut. Perbedaan fraksi protein, ukuran globula lemak, kapasitas penyangga, dan kandungan mineral dapat memengaruhi laju pengasaman, struktur gel, dan aktivitas komunitas kefir [5–7]. M'hir et al. menunjukkan bahwa kefir dari susu sapi, domba, dan kambing mengalami derajat pengasaman yang berbeda setelah fermentasi pada kondisi yang sama [5]. Di Indonesia, Rusdhi et al. melaporkan bahwa jenis susu dan lama fermentasi berpengaruh nyata terhadap alkohol serta total asam kefir [12], sementara Wulansari et al. menunjukkan bahwa formulasi dan penyimpanan memengaruhi alkohol, keasaman, viskositas, dan penerimaan sensori kefir susu kambing [13]. Temuan tersebut menegaskan bahwa hasil antarpemeriksaan harus ditafsirkan berdasarkan substrat, starter, suhu, dan lama fermentasi yang digunakan.

Meskipun berbagai penelitian telah mengevaluasi mutu kimia kefir, data berurutan yang menghubungkan perubahan pH dengan akumulasi etanol selama fermentasi susu kambing masih terbatas, khususnya pada bahan baku dan grain kefir yang digunakan secara lokal. Selain itu, penetapan etanol dan asam laktat sering dilaporkan secara terpisah sehingga keterkaitan antara pengasaman matriks dan aktivitas khamir belum tergambarkan secara memadai. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi etanol secara kualitatif, menentukan kadar etanol selama enam hari fermentasi menggunakan spektrofotometri sinar tampak, mengevaluasi perubahan pH dan karakteristik organoleptik, serta menentukan kadar asam laktat kefir setelah 24 jam menggunakan HPLC-UV. Pendekatan ini diharapkan memberikan gambaran yang lebih utuh mengenai perubahan fisikokimia kefir susu kambing selama fermentasi.

Metode Penelitian

Desain, bahan, dan peralatan

Penelitian ini menggunakan desain deskriptif-analitik dengan pengukuran instrumental berulang. Susu kambing segar dan kefir komersial diperoleh di Kota Medan, sedangkan grain kefir berasal dari pemasok komersial. Bahan analitik terdiri atas etanol absolut, baku asam laktat, KH_2PO_4 , H_3PO_4 , akuades, iodium, KI, FeCl_3 , NaOH, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, Na_2CO_3 , asam asetat, dan H_2SO_4 . Analisis dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific dan sistem HPLC Rigol. Pemisahan kromatografi menggunakan fase gerak buffer fosfat 50 mM dengan deteksi UV pada 210 nm.

Pembuatan kefir

Susu kambing sebanyak 250 mL dipanaskan hingga 75 °C, dipindahkan ke gelas beker, dan didinginkan hingga 25 ± 2 °C. Grain kefir ditambahkan sebanyak 4% (b/v), kemudian campuran dihomogenkan secara perlahan dan ditempatkan dalam wadah kaca 250 mL yang ditutup serta dilapisi aluminium foil. Fermentasi dilakukan pada 25 ± 2 °C selama 1, 2, 3, 4, 5, atau 6 hari. Pada setiap titik waktu, sampel dihomogenkan; sebanyak 13 mL dipindahkan ke tabung sentrifus dan disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 20 menit. Supernatan yang sedikit keruh dipisahkan dari endapan, kemudian disaring dengan kertas saring hingga diperoleh filtrat jernih untuk analisis.

Nilai pH susu segar, kefir selama fermentasi, dan kefir komersial diukur menggunakan pH meter Milwaukee setelah kalibrasi. Elektroda dicelupkan ke dalam sampel hingga pembacaan stabil. Evaluasi organoleptik pendahuluan dilakukan oleh lima panelis terhadap aroma, rasa, dan tekstur menggunakan skala delapan tingkat. Karena jumlah panelis terbatas dan tidak dirancang sebagai uji konsumen, data organoleptik dianalisis secara deskriptif sebagai karakterisasi awal produk.

Identifikasi dan penetapan etanol

Etanol diidentifikasi melalui tiga reaksi: pembentukan endapan kuning pada uji iodoform, perubahan warna jingga menjadi hijau pada oksidasi dengan kalium dikromat dalam suasana asam, dan terbentuknya aroma ester setelah penambahan asam asetat-asam sulfat serta pemanasan [16]. Untuk analisis kuantitatif disiapkan baku etanol 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; dan 1,3 g/dL. Sebanyak 0,5 mL baku atau sampel ditempatkan pada sisi luar cawan Conway, 3 mL dikromat asam pada kompartemen tengah, dan 1 mL Na_2CO_3 pada sisi lain. Cawan ditutup, diinkubasi dalam penangas air 90 °C selama 20 menit, dan larutan kompartemen tengah diencerkan hingga 25 mL. Absorbansi dibaca pada 443 nm terhadap blanko [17].

Penetapan asam laktat dengan HPLC-UV

Fase gerak dibuat dengan melarutkan 6,8 g KH_2PO_4 dalam 900 mL air, mengatur pH menjadi 2,8 menggunakan asam fosfat, kemudian menambahkan air hingga 1.000 mL. Larutan disaring melalui membran selulosa nitrat 0,45 μm . Larutan induk asam laktat 10% disiapkan dalam buffer fosfat, kemudian diencerkan menjadi 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0% untuk kalibrasi. Sampel kefir 24 jam disentrifugasi pada 3.500 rpm selama 20 menit dan disaring; sebanyak 1 mL filtrat diencerkan dengan buffer fosfat hingga 5 mL dan disaring menggunakan syringe filter 0,22 μm . Analisis HPLC-UV dilakukan pada 210 nm dengan laju alir 1 mL/menit dan volume injeksi 20 μL . Identifikasi asam laktat didasarkan pada kesesuaian waktu retensi sampel dengan baku, sedangkan kadar dihitung dari persamaan regresi luas area terhadap konsentrasi.

Validasi dan analisis statistik

Linearitas dinilai berdasarkan persamaan regresi dan koefisien determinasi, sedangkan presisi pengukuran dinyatakan sebagai simpangan baku dan relative standard deviation (RSD) dari enam pengukuran teknis. Perbedaan kadar etanol antarwaktu fermentasi dianalisis menggunakan ANOVA satu arah pada taraf signifikansi 5%, dan kecenderungan perubahan kadar dievaluasi melalui regresi terhadap rerata harian. Karena pengulangan dilakukan pada tingkat analitik, hasil inferensial merepresentasikan variasi pengukuran dalam sampel yang dianalisis. Parameter LOD, LOQ, akurasi, dan robustness tidak disajikan karena data yang diperlukan untuk perhitungannya tidak tersedia. Evaluasi kinerja metode mengacu pada prinsip validasi prosedur analitik ICH Q2(R2) [20].

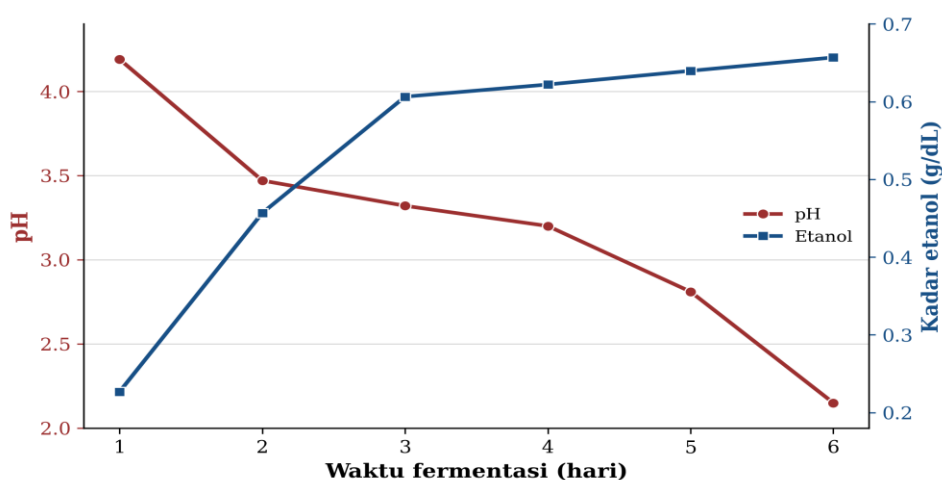
Hasil dan Pembahasan

Perubahan pH dan karakteristik organoleptik

Susu kambing segar memiliki pH 6,66. Setelah inokulasi grain kefir, pH menurun secara progresif dari 4,19 pada hari pertama menjadi 2,15 pada hari keenam. Sebaliknya, enam pengukuran kefir komersial berada pada rentang pH yang lebih sempit, yaitu 3,82–3,88. Penurunan pH selama fermentasi menunjukkan akumulasi asam organik, terutama laktat, akibat metabolisme bakteri asam laktat. Perubahan paling besar terjadi antara susu segar dan hari pertama serta berlanjut hingga hari kedua; setelah itu pengasaman berlangsung lebih bertahap sebelum kembali menurun tajam pada hari kelima dan keenam.

Tabel 1. Perubahan pH susu kambing selama fermentasi dan rentang pH kefir komersial.

Sampel/waktu	pH
Susu kambing segar	6,66
Hari ke-1	4,19
Hari ke-2	3,47
Hari ke-3	3,32
Hari ke-4	3,20
Hari ke-5	2,81
Hari ke-6	2,15
Kefir komersial (rentang)	3,82–3,88



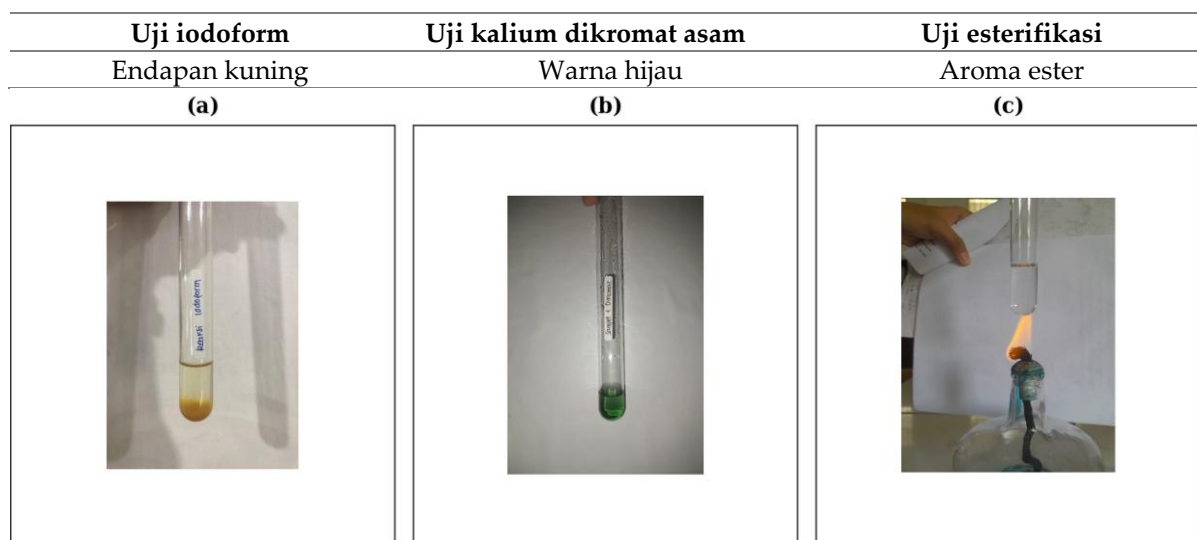
Gambar 1. Hubungan perubahan pH dan kadar etanol selama enam hari fermentasi kefir susu kambing.

Penurunan pH berlangsung bersamaan dengan peningkatan etanol, tetapi kedua parameter merepresentasikan jalur metabolik yang berbeda dan saling berinteraksi. Bakteri asam laktat mengonversi laktosa menjadi laktat, sedangkan khamir menghasilkan etanol dan CO₂ dari gula fermentabel. Lingkungan yang semakin asam dapat menekan sebagian mikroorganisme, tetapi khamir toleran asam masih dapat mempertahankan aktivitasnya; kondisi ini menjelaskan mengapa etanol tetap meningkat ketika pH terus menurun [2,8–10]. Sánchez-Rodríguez et al. juga melaporkan perubahan luas pada gula dan asam organik kefir susu kambing sepanjang fermentasi [3]. Dibandingkan pH kefir komersial yang berada sekitar 3,8, pH 2,15 pada hari keenam menunjukkan fermentasi yang sangat lanjut dan kemungkinan berada di luar karakteristik sensori kefir konsumsi biasa.

Penilaian organoleptik pendahuluan menghasilkan skor rerata aroma, rasa, dan tekstur sebesar 7,6; 6,8; dan 5,8 pada susu segar, serta 7,0; 6,8; dan 6,6 pada kefir. Peningkatan skor tekstur setelah fermentasi konsisten dengan pembentukan curd dan eksopolisakarida, sedangkan aroma dan rasa mencerminkan kombinasi pengasaman serta pembentukan metabolit volatil [9,13]. Akan tetapi, hasil tersebut hanya menggambarkan persepsi lima panelis dan belum dapat diperlakukan sebagai bukti penerimaan konsumen. Evaluasi sensori berikutnya memerlukan jumlah panelis yang memadai, prosedur pembutaan, urutan penyajian acak, dan instrumen penilaian yang tervalidasi.

Identifikasi kualitatif etanol

Ketiga pengujian memberikan respons positif, yaitu terbentuknya endapan kuning pada uji iodoform, perubahan warna jingga menjadi hijau pada uji kalium dikromat dalam suasana asam, serta munculnya aroma ester pada uji esterifikasi (Gambar 2). Perubahan warna pada uji dikromat berlangsung melalui reduksi Cr(VI) menjadi Cr(III), sedangkan reaksi iodoform berkaitan dengan keberadaan gugus metil-karbinol. Meskipun mendukung keberadaan etanol, kedua reaksi tersebut tidak sepenuhnya spesifik karena senyawa karbonil atau alkohol tertentu dapat memberikan respons serupa. Oleh sebab itu, hasil uji kualitatif diposisikan sebagai bukti pendahuluan yang diperkuat oleh analisis kuantitatif. Pertimbangan selektivitas menjadi relevan pada matriks kefir karena fermentasi menghasilkan asetaldehida, alkohol, asam organik, dan berbagai senyawa volatil lain [8,9,16,17,21].



Gambar 2. Hasil uji kualitatif etanol : (a) iodoform, (b) kalium dikromat asam, dan (c) esterifikasi.

Kalibrasi dan karakteristik metode etanol

Tabel 2. Respons kalibrasi etanol pada 443 nm.

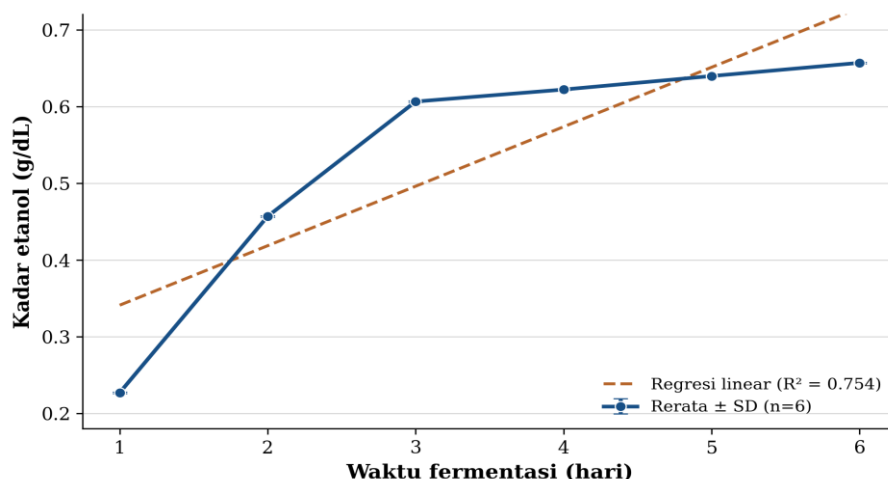
Konsentrasi (g/dL)	Absorbansi
Blanko	0,983
0,5	0,679
0,7	0,583
0,9	0,476
1,1	0,369
1,3	0,270

Absorbansi menurun seiring peningkatan konsentrasi etanol dan menghasilkan persamaan $y = -0,5461x + 0,9696$ dengan $R^2 = 0,996$. Kemiringan negatif mencerminkan berkurangnya konsentrasi Cr(VI) akibat reduksi oleh etanol menjadi Cr(III); dengan demikian, sinyal analitik merepresentasikan dikromat yang tersisa setelah reaksi, bukan serapan langsung etanol. Karakteristik respons tersebut konsisten dengan prinsip spektrofotometri dikromat yang dilaporkan Nahak et al. [17]. Koefisien determinasi yang tinggi menunjukkan hubungan konsentrasi-respons yang baik pada rentang pengujian. Namun, RSD kefir komersial sebesar 5,66% mengindikasikan bahwa variasi preparasi dan efek matriks masih memengaruhi presisi. Protein, lipid, asam organik, serta komponen volatil kefir berpotensi memodifikasi efisiensi mikrodifusi maupun reaksi oksidasi. Pengembangan metode selanjutnya dapat mencakup evaluasi blanko matriks, recovery, standard addition, selektivitas, LOD, LOQ, dan robustness sesuai ICH Q2(R2) [20]. Analisis headspace GC-FID atau GC-MS dapat digunakan sebagai metode pembandingan karena memberikan pemisahan yang lebih selektif terhadap komponen volatil.

Profil kadar etanol selama fermentasi

Tabel 3. Kadar etanol kefir susu kambing selama fermentasi (enam pengukuran teknis per hari).

Hari	Rerata (g/dL)	SD	RSD (%)
1	0.226879	0.001059	0.47
2	0.456818	0.001056	0.23
3	0.606410	0.000993	0.16
4	0.622048	0.001035	0.17
5	0.639667	0.000816	0.13
6	0.656884	0.001049	0.16



Gambar 3. Perubahan kadar etanol selama enam hari fermentasi.

Kadar etanol meningkat tajam pada hari ke-1 hingga ke-3, kemudian bertambah lebih lambat hingga hari ke-6 (Gambar 3). ANOVA satu arah menunjukkan perbedaan kadar antarwaktu pengamatan ($F=165741,1$; $p<0,001$), sedangkan regresi linear terhadap seluruh rerata harian menghasilkan $R^2=0,754$. Koefisien determinasi tersebut menunjukkan bahwa perubahan etanol tidak sepenuhnya mengikuti kinetika linear tunggal. Profil data lebih mencerminkan dua fase, yaitu akumulasi cepat pada awal fermentasi dan kecenderungan menuju plateau pada fase berikutnya. Pola ini selaras dengan suksesi mikroba kefir: bakteri asam laktat menginisiasi pengasaman matriks, kemudian aktivitas khamir berkontribusi terhadap pembentukan etanol dan CO_2 [8,9]. Alraddadi et al. melaporkan perubahan struktur komunitas mikroba grain dan minuman kefir sepanjang fermentasi, yang dapat menghasilkan laju pembentukan metabolit yang tidak konstan [26]. Simpangan baku yang kecil pada penelitian ini menunjukkan keterulangan analitik yang tinggi, tetapi tidak menggambarkan variasi antarbatch karena fermentasi biologis independen tidak dilakukan.

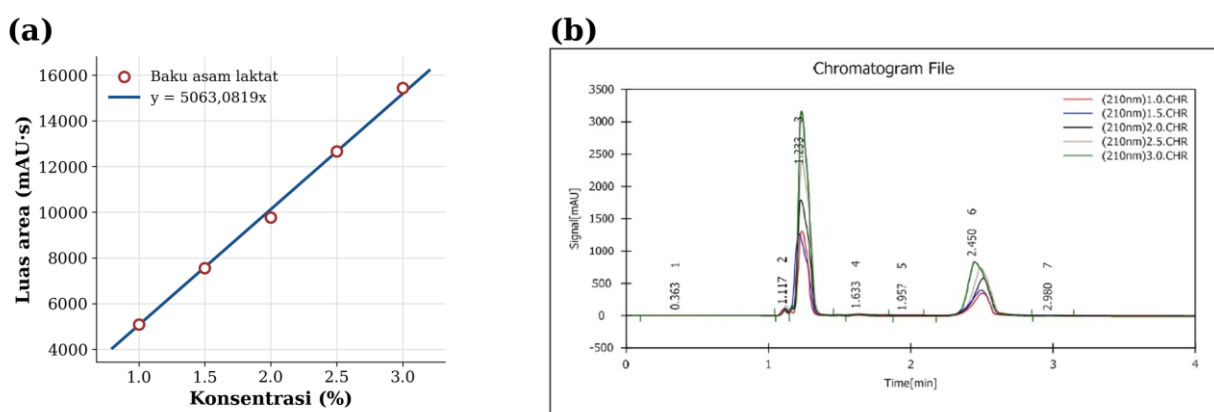
Peningkatan etanol berkaitan dengan aktivitas khamir seperti *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, dan *Kazachstania* yang memanfaatkan gula sederhana dan, pada spesies tertentu, laktosa untuk membentuk etanol dan CO_2 . Pada saat yang sama, bakteri asam laktat mengubah laktosa menjadi laktat dan menyediakan metabolit yang mendukung hubungan silang dengan khamir; sebaliknya, khamir menyediakan vitamin, asam amino, dan faktor pertumbuhan bagi bakteri [2,8–10,27]. Sánchez-Rodríguez et al. memperlihatkan melalui metabolomik bahwa lama fermentasi dan perlakuan panas mengubah profil gula, asam organik, asam amino, dan metabolit kefir susu kambing [3]. Dengan demikian, kenaikan cepat pada hari 1–3 kemungkinan mencerminkan ketersediaan substrat dan pertumbuhan aktif, sedangkan pelandaian berikutnya dapat disebabkan oleh berkurangnya gula fermentabel, penurunan pH, akumulasi etanol/asam, dan pergeseran komunitas. Wang et al. menunjukkan bahwa aktivitas menyerupai metabolisme khamir juga memengaruhi produksi kefir oleh *Lactobacillus kefirianofaciens* [28]. Besarnya etanol perlu dibaca terhadap kondisi proses: Rusdhi et al. melaporkan sekitar 0,59% pada kefir susu kambing [12], sedangkan Wulansari et al. memperoleh rerata sekitar 0,44% dan menemukan pengaruh formulasi serta waktu penyimpanan [13]. Nilai hari ke-2 penelitian ini (0,457 g/dL) dekat dengan rentang tersebut, sedangkan hari ke-6 mencapai 0,657 g/dL. Perbedaan dapat berasal dari konsentrasi grain, mikrobiota starter, komposisi susu, suhu, aerasi, lama fermentasi, dan metode analisis [3,12–15,26,29]. Fermentasi enam hari jauh melampaui proses tradisional

sekitar 18–24 jam pada 20–25 °C [10,29]; karena itu, nilai akhir menggambarkan fermentasi berkepanjangan, bukan komposisi kefir siap konsumsi. Pengendalian waktu dan suhu menjadi titik kendali penting untuk mempertahankan etanol rendah dan mutu sensori konsisten.

Kadar asam laktat kefir 24 jam

Tabel 4. Hasil penetapan asam laktat kefir setelah fermentasi 24 jam.

Pengulangan	Luas area	Kadar (%)
P1	4189,282	4,1371
P2	4097,106	4,0461
P3	3383,506	3,3423
P4	4135,261	4,0837
P5	4217,255	4,1647
P6	3813,165	3,7657



Gambar 4. (a) Kurva kalibrasi dan (b) kromatogram asam laktat.

Kalibrasi asam laktat menghasilkan persamaan $y = 5063,0819x$ dengan $R^2 = 0,996$ dan waktu retensi sekitar 1,233 menit. Enam pengukuran menghasilkan kadar rerata 3,923% dengan SD 0,322% dan RSD 8,21%. Variasi ini lebih besar daripada variasi pengukuran etanol dan mengindikasikan kontribusi tahap preparasi sampel, kompleksitas matriks, atau integrasi puncak terhadap ketidakpastian hasil. Kadar yang diperoleh juga lebih tinggi dibandingkan beberapa laporan terdahulu. Rusdhi et al. melaporkan total asam sekitar 0,787% pada kefir susu kambing [12], sedangkan Wulansari et al. memperoleh keasaman 1,26–1,66% selama penyimpanan [13]. Tinjauan terbaru menempatkan kadar laktat kefir umumnya pada kisaran 0,6–1,8% (b/v), meskipun komposisinya sangat dipengaruhi jenis susu, komunitas starter, dan kondisi fermentasi [30].

Kadar asam laktat hanya ditentukan setelah fermentasi 24 jam sehingga hubungan kinetik antara pembentukan laktat dan etanol pada hari berikutnya belum dapat dievaluasi. Secara biologis, laktat terakumulasi pada tahap awal seiring aktivitas bakteri asam laktat, kemudian profilnya dipengaruhi oleh ketersediaan substrat, toleransi terhadap kondisi asam, dan interaksi metabolik dengan khamir [2,3,8]. M'hir et al. menunjukkan bahwa jenis susu memengaruhi derajat pengasaman kefir setelah fermentasi 24 jam pada 25 °C melalui perbedaan komposisi substrat dan dinamika komunitas mikroba [5]. Pada aspek analitik, Milagres et al. menunjukkan bahwa kuantifikasi laktat dalam matriks susu dengan HPLC ion-exclusion memerlukan pemisahan dan validasi yang memadai [18].

Keragaman geografis grain kefir dapat menghasilkan komposisi bakteri dan khamir yang berbeda sehingga reproduktibilitas antarstarter tidak dapat diasumsikan [26,27]. Tinjauan kritis terkini juga menempatkan variasi substrat, proses, komunitas mikroba, dan metode analitik sebagai sumber utama heterogenitas penelitian kefir [29]. Penelitian lanjutan dengan sedikitnya tiga batch independen, pemantauan suhu dan pH, serta penentuan serentak etanol, laktat, gula sisa, total asam, dan viabilitas mikroba pada titik waktu yang sama akan memungkinkan pemodelan kinetika fermentasi yang lebih kuat.

Kesimpulan

Etanol terdeteksi pada kefir susu kambing hasil fermentasi dan kefir susu kambing komersial. Pada kefir hasil fermentasi, kadar etanol meningkat secara berturut-turut dari 0,226878 g/dL pada hari ke-1 menjadi 0,456817 g/dL pada hari ke-2, 0,606410 g/dL pada hari ke-3, 0,622084 g/dL pada hari ke-4, 0,639666 g/dL pada hari ke-5, dan 0,656884 g/dL pada hari ke-6; sementara itu, kadar etanol kefir komersial sebesar 0,452541 g/dL. Pola tersebut menunjukkan bahwa, pada kondisi penelitian ini, perpanjangan waktu fermentasi berkaitan dengan peningkatan kadar etanol. Asam laktat pada kefir susu kambing setelah fermentasi 24 jam terukur sebesar 3,923264 g/dL. Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk menentukan kadar etanol, sedangkan HPLC-UV dapat digunakan untuk menentukan kadar asam laktat pada kondisi analisis yang diterapkan dalam penelitian ini.

Konflik Kepentingan

Para penulis menyatakan tidak memiliki konflik kepentingan finansial maupun nonfinansial yang dapat memengaruhi pelaksanaan penelitian, interpretasi hasil, atau publikasi artikel ini.

Referensi

- [1] Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Pagnoncelli MGB, Vandenberghe LPS, et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation — A review. *Food Microbiol.* 2017;66:86–95. doi:10.1016/j.fm.2017.04.004.
- [2] Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *J Appl Microbiol.* 2019;126:686–700. doi:10.1111/jam.14107.
- [3] Sánchez-Rodríguez R, Terriente-Palacios C, García-Olmo J, Osorio S, Rodríguez-Ortega MJ. Combined metabolomic and NIRS analyses reveal biochemical and metabolite changes in goat milk kefir under different heat treatments and fermentation times. *Biomolecules.* 2024;14:816. doi:10.3390/biom14070816.
- [4] Azizi NF, Kumar MR, Yeap SK, Abdullah JO, Khalid M, Omar AR, et al. Kefir and its biological activities. *Foods.* 2021;10:1210. doi:10.3390/foods10061210.
- [5] M'hir S, et al. Comparison of milk kefirs obtained from cow's, ewe's and goat's milk: antioxidant role of microbial-derived exopolysaccharides. *Antioxidants.* 2024;13:335. doi:10.3390/antiox13030335.
- [6] Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin Res.* 2007;68:88–113. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.
- [7] Ranadheera CS, Naumovski N, Ajlouni S. Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2018;131:1–7. doi:10.1016/j.ibiod.2018.01.009.
- [8] Walsh AM, Crispie F, Kilcawley K, O'Sullivan O, O'Sullivan MG, Claesson MJ, et al. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *mSystems.* 2016;1:e00052-16. doi:10.1128/mSystems.00052-16.
- [9] Dertli E, Çon AH. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT.* 2017;85:151–157. doi:10.1016/j.lwt.2017.07.017.
- [10] Prado MR, Blandón LM, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Front Microbiol.* 2015;6:1177. doi:10.3389/fmicb.2015.01177.
- [11] Leite AMO, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VMF. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Braz J Microbiol.* 2013;44:341–349. doi:10.1590/S1517-83822013000200001.
- [12] Rusdhi A, Siswoyo P, Adelia T. Test the chemical quality of kefir from goat's milk and cow's milk with different fermentation times. *J Pharm Sci.* 2023;6:1626–1634. doi:10.36490/journal-jps.com.v6i4.284.
- [13] Wulansari PD, Widodo, Sunarti, Nurliyani. Physicochemical, microbiological, and sensory evaluation of kefir produced from goat milk containing *Lactocaseibacillus casei* AP and/or oat milk during storage. *Food Sci Technol.* 2023;43:e127322. doi:10.5327/fst.127322.
- [14] Setiawati L, Rizqiati H, Susanti DS. Analisis rendemen, kadar alkohol, nilai pH dan total BAL pada kefir whey susu kambing dengan lama fermentasi yang berbeda. *J Teknol Pangan.* 2019;3:1–6.

- [15] Wihenti HR, Susanti S, Nurwantoro, Al-Baarri AN, Slamet YB. Pengaruh waktu fermentasi terhadap sifat fisikokimia kefir whey dari susu kambing. *Warta IHP*. 2021;38:54–60.
- [16] Sari M, Fajar N. Analisis kualitatif dan kuantitatif kandungan alkohol pada tapai ketan di Kota Batusangkar. *Sainstek*. 2018;10:33–36.
- [17] Nahak BRH, Aliah AI, Karim SF. Analisis kadar alkohol pada minuman beralkohol tradisional (arak) dengan metode spektrofotometri UV-Vis. *J Sains Kesehat*. 2021;3:448–454. doi:10.25026/jsk.v3i4.360.
- [18] Milagres MP, Brandão SCC, Magalhães MA, Minim VPR. Development and validation of the high performance liquid chromatography-ion exclusion method for detection of lactic acid in milk. *Food Chem*. 2012;135:1078–1082. doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.047.
- [19] Chen YF, Wang JC, Yun ZY, Zhang HP. Study on organic acids in traditionally fermented milk by HPLC. *China Dairy Ind*. 2007;35:54–58.
- [20] International Council for Harmonisation. ICH Q2(R2): Validation of analytical procedures. Geneva: ICH; 2023.
- [21] Rutkowska J, Antoniewska-Krzeska A, Żbikowska A, Cazón P, Vázquez M. Volatile composition and sensory profile of lactose-free kefir. *Molecules*. 2022;27:5386. doi:10.3390/molecules27175386.
- [22] Bourrie BCT, Willing BP, Cotter PD. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Front Microbiol*. 2016;7:647. doi:10.3389/fmicb.2016.00647.
- [23] Rosa DD, Dias MMS, Grześkowiak ŁM, Reis SA, Conceição LL, Peluzio MCG. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev*. 2017;30:82–96. doi:10.1017/S0954422416000275.
- [24] Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kefir grains and milks. *PLoS One*. 2013;8:e69371. doi:10.1371/journal.pone.0069371.
- [25] Farag MA, Jomaa SA, El-Wahed AA, El-Seedi HR. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*. 2020;12:346. doi:10.3390/nu12020346.
- [26] Alraddadi FAJ, Ross T, Powell SM. Evaluation of the microbial communities in kefir grains and kefir over time. *Int Dairy J*. 2023;136:105490. doi:10.1016/j.idairyj.2022.105490.
- [27] Ströher JA, Oliveira WDC, de Freitas AS, Salazar MM, da Silva LDFF, Bresciani L, et al. A global review of geographical diversity of kefir microbiome. *Fermentation*. 2025;11:150. doi:10.3390/fermentation11030150.
- [28] Wang Y, Wang Z, Yu Y. Kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under conditions mimicking yeast activities in kefir grains. *Front Microbiol*. 2023;14:1236634. doi:10.3389/fmicb.2023.1236634.
- [29] De Souza HF, Monteiro GF, Bogáz LT, Freire ENS, Pereira KN, de Carvalho MV, et al. Bibliometric analysis of water kefir and milk kefir in probiotic foods from 2013 to 2022: a critical review of recent applications and prospects. *Food Res Int*. 2024;175:113716. doi:10.1016/j.foodres.2023.113716.
- [30] Kurniawan R, et al. Kefir as a functional probiotic: microbial composition and therapeutic potential. *Front Food Sci Technol*. 2025;5:1725280. doi:10.3389/frfst.2025.1725280.