

## DIVERSITAS MIKROORGANISME PADA GRAIN KEFIR

Putri Dian Wulansari\*, Novia Rahayu, Firgian Ardigurnita, dan Nurul Frasiska

<sup>1</sup>Prodi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Perjuangan Tasikmalaya, Jalan Peta No. 177 Tasikmalaya, Jawa Barat 46115

\*Korespondensi email: putridian@unper.ac.id

**Abstrak.** Grain kefir yang digunakan pada pembuatan produk kefir memiliki mikroba yang kompleks dan beragam. Tujuan dari artikel ini adalah untuk meninjau tentang diversitas mikroba pada grain kefir yang berkaitan dengan faktor-faktor yang mempengaruhi, komposisi dan metode dalam mengidentifikasi mikroba yang terdapat pada grain kefir. Metode yang digunakan dalam menyusun artikel ini adalah telaah sistematis (*systematic review*) terhadap hasil-hasil penelitian yang terkait dengan diversitas mikroorganisme pada grain kefir. Penelitian ini menunjukkan terdapat banyak factor yang dapat mempengaruhi diversitas microbiota grain kefir yaitu wilayah geografis, mikroba asal, pemeliharaan, kondisi penyimpanan, rasio grain dan susu, waktu dan suhu inkubasi, sanitasi, dan susu yang digunakan. Artikel ini juga menuliskan tentang metode molekuler seperti: amplifikasi berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR), pengurutan gen 16S rRNA dan Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) dalam mengidentifikasi mikroba dalam grain kefir.

**Kata kunci:** BAL, Diversitas, Grain kefir, *Yeast*

**Abstract.** Kefir grains used in the manufacture of kefir products has complex and diverse microbes. The purpose of this article is to review the microbial diversity in kefir grains related to influencing factors, composition and methods in identifying microbes contained in kefir grains. The method used in compiling this article is a systematic review of the results of research related to the diversity of microorganisms in kefir grains. This study shows that there are many factors that can affect the diversity of the kefir grain microbiota, namely the geographical area, microbes of origin, maintenance, storage conditions, the ratio of grain and milk, the time and temperature of incubation, sanitation, and the milk used. This article also writes about molecular methods such as: Polymerase Chain Reaction (PCR)-based amplification, 16S rRNA gene sequencing and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in identifying microbes in kefir grains.

**Keyword:** LAB, Diversity, Grain kefir, *Yeast*

### PENDAHULUAN

Kefir memiliki rasa yang sangat kompleks karena grain kefir yang digunakan dalam pembuatannya memiliki mikrobiota yang sangat beragam dan kompleks (Singh and Shah, 2017). Kefir memiliki manfaat kesehatan termasuk fisiologis, profilaksis dan terapeutik. Manfaat kesehatan ini berasal dari berbagai senyawa bioaktif yang dihasilkan selama proses fermentasi dan keanekaragaman mikrobiotanya, yang bertindak baik secara independen maupun sinergis (Leite, et al., 2013). Mikroorganisme yang ada dalam biji kefir terus berkembang selama proses fermentasi hingga proses fermentasinya berakhir menggunakan semua nutrisi yang tersedia di dalam susu terutama laktosa sebagai sumber karbon dan energi (Schwan, et al., 2016).

Grain kefir yang digunakan dalam memproduksi kefir sebagai starter mengandung mikrobiota yang beragam (Ozcan, et al., 2019). Diversitas mikroba dan asosiasi mikroba yang kompleks pada setiap grain kefir menyebabkan kesulitan dalam mendapatkan starter kefir yang konstan untuk produksi kefir tingkat industri (skala besar). Perlu diketahui dengan baik faktor-faktor apa saja yang dapat mempengaruhi diversitas mikroba yang ada pada grain kefir. Hal ini penting agar mikroba pada grain kefir lebih stabil dan tidak cepat berubah seiring waktu. Tujuan dari artikel ini adalah untuk meninjau tentang diversitas

mikroba pada grain kefir yang berkaitan dengan faktor-faktor yang mempengaruhi, komposisi dan metode dalam mengidentifikasi mikroba yang terdapat pada grain kefir.

## **METODE DAN RUANG LINGKUP KAJIAN**

Metode yang digunakan dalam menyusun artikel ini adalah kajian pustaka terstruktur atau telaah sistematis (*systematic review*) dengan menggunakan mesin pencari *Google Scholar*. Referensi yang dipilih adalah referensi yang relevan dengan mikroorganisme yang ada pada grain kefir, yang dipublikasikan pada jurnal ilmiah. Batasan ruang lingkup pada manuskrip ini diversitas mikroorganisme baik pada bakteri asam laktat (BAL), bakteri asam asetat dan yeast pada grain kefir, dan metode untuk mengidentifikasinya.

## **ISI KAJIAN**

Komposisi mikroba kefir secara keseluruhan sangat kompleks dan bervariasi diantara wilayah geografis. Diversitas mikroba pada grain kefir dipengaruhi oleh banyak hal, utamanya adalah mikroba asal, pemeliharaan dan kondisi penyimpanan (Schwan, Magalhães-Guedes and Dias, 2016, Garrote, et al., 2010). Guzel- seydim, et al. (2005) menyatakan bahwa kualitas produk dan diversitas pada grain kefir juga dipengaruhi oleh rasio penggunaan grain kefir dan susu, waktu inkubasi dan suhu, sanitasi selama pemisahan grain kefir, pencucian grain kefir, dan penyimpanan pada suhu dingin. Sedangkan Dertli and Çon (2017) menyatakan bahwa selain wilayah geografis tempat grain kefir terbentuk, jenis susu merupakan faktor yang mempengaruhi grain kefir. Diversitas mikoba pada grain kefir ini bertanggung jawab terhadap fisikokimia dan aktifitas biologi masing-masing kefir (da Cruz Cabral, et al., 2013) dan memiliki peran unik dalam karakteristik produk (Karaçalı, et al., 2018).

Kefir yang diproduksi secara komersial memerlukan diversitas dari grain kefir yang sama sehingga mampu menghasilkan produk kefir yang seragam (Schwan, Magalhães-Guedes and Dias, 2016). Viabilitasnya dari grain kefir dapat dijaga dengan memastikan keseimbangan jumlah bakteri dan yeast menggunakan fermentasi yang dapat meningkatkan biomassa pada grain (Garrote, et al., 2001). Peningkatan biomassa sel mikroba pada grain sangat tergantung pada suhu fermentasi, pH dan keberadaan nutrisi untuk pertumbuhan mikroba. Komposisi mikoba pada grain kefir akan stabil jika disimpan pada kondisi yang tepat (Witthuhn, et al., 2005) dan diinkubasi dibawah kondisi dan fisiologis yang sesuai (Vardjan, et al., 2013). Namun, asosiasi mikrobiologis yang kompleks membuat grain kefir sulit untuk mendapatkan kultur starter kefir yang pasti dan konstan yang sesuai untuk produksi kefir industr dengan sifat konvensional (Vardjan, Lorbeg, Rogelj and Majhenič, 2013).

Tabel 1. Komposisi mikroba yang bersumber dari grain kefir dengan metode yang digunakannya

Asal	Metode analisis	Mikroorganisme	Pustaka
Turkey	NGS	<b>Bakteri:</b> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Enterobacter amnigenus</i> , <i>Enterobacter homaechei</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus apis</i> , <i>Lactobacillus ultunensis</i> , <i>Acinetobacter rhizosphaerae</i> , <i>Enterococcus lactis</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas azotoformans</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas otitidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Enterobacter soli</i> <b>Yeast:</b> <i>Alternaria spp</i> , <i>aspergillus amstelodami</i> , <i>Dipodascus geotrichum</i> , <i>Dipodascaceae spp</i> , <i>candida parapsilosis</i> , <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Saccharomyces cerevuseae</i> , <i>Malassezia spp</i> , <i>Rhodotorula dairenensis</i> , <i>Rhodotorula mucilaginoso</i> , <i>Trichosporon spp</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Aspergillus spp</i> , <i>Kazachstania unispora</i> , <i>Cryptococcus victoriae</i>	(Dertli and Çon, 2017)
Brazil	PCR-DGGE and pyrosequencing analysis	<b>Bakteri:</b> <i>Leuconostocaceae</i> , <i>Pseudomonadaceae</i> , <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Streptococcaceae</i> , <i>Bifidobacteriaceae</i> , <i>Solirubrobacteraceae</i> , <i>Lactobacillaceae</i>	(Leite, Mayo, Rachid, Peixoto, Silva, Paschoalin and Delgado, 2012)
Tibet	a high-throughput sequencing technique	<b>Bakteri:</b> <i>L.kefiri</i> K1-M1, <i>L. kefir</i> K1-M2, <i>L. kefiranofaciens</i> K1, <i>L. kefiranofaciens</i> G-M1, <i>L. kefir</i> G-M2, <i>L. kefiranofaciens</i> subsp <i>kefiri granum</i> G-M6, <i>K. marxianus</i> Y1, <i>L. marxianus</i> G-Y3, <i>E. durans</i> K2-M3, <i>E. fructosus</i> K2-Y6, <i>L. kefir</i> K2-MY1, <i>L.paracasei</i> K2-MX1, <i>K. marxianus</i> K2-Y1, <i>A. fabarum</i> K2-Y4, <i>L. Kefiri</i> K2-GM5, <i>E. Durans</i> K2-M2, <i>K marxianus</i> K2-Y3	(Wang, et al., 2021)
Tibet	Analisis Metagenome	<b>Bakteri:</b> <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Acetobacter</i> , <i>Leuconostoc</i> , and <i>Streptococcus had been reported before in TK</i> , while <i>Shewanella</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Dysgonomonas</i> , <i>Weissella</i> , and <i>Pseudomonas</i>	(Gao, et al., 2013)
Turki	16S rRNA analysis	<b>Bakteri:</b> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus amylovorus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Pediococcus claussenii</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pediococcus damnosus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Tetragenococcus halophilus</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Pediococcus halophilus</i> , <i>Lactobacillus gasserii</i> , <i>Lactobacillus rossiae</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus gallinarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>	(Nalbantoglu, Cakar, Dogan, Abaci, Ustek, Sayood and Can, 2014)
Malaysia	16 S metagenomics menggunakan MEGAN and BaseSpace	<b>Bakteri:</b> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus ultunensis</i> , <i>Lactobacillus apis</i> , <i>Lactobacillus taiwanensis</i> , <i>Lactobacillus gigeriorum</i> , <i>Pediococcusargentini</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Phylobacteriummyrsinacearum</i> , <i>Lactobacillus faeni</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus parakefiri</i> , <i>Rhodococcuserythropolis</i> , <i>Acinetobacterjernbergiae</i> , <i>Lactobacillus thailandensis</i> , <i>Pediococcuscellicola</i> , <i>Mesoplasmaentomophilum</i> , <i>Rhodococcusqingshengii</i> , <i>Lactobacillus senmaizukei</i> , <i>Lactobacillus tucetii</i> , <i>Cohnella soli</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus nagelii</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Rothiaamarae</i> , <i>Lactobacillus hilgardi</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Acinetobacterjohnsonii</i> , <i>Staphylococcus kloosii</i> , <i>Lactobacillus animalis</i> , <i>Lactobacillus dulbrueckii</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>	(Zamberi, et al., 2016)

Komposisi spesies mikroba pada grain kefir sangat kompleks terdiri dari dominasi bakteri asam laktat (BAL), bakteri asam asetat, dan yeast (Pogačić, et al., 2013). Spesies mikroba ini diklasifikasikan menjadi: bakteri asam laktat homofermentatif dan heterofermentatif, sedangkan yeast dibagi menjadi

kategori fermentasi laktosa dan non laktosa (Cheirsilp and Radchabut, 2011). Kelompok BAL homofermentatif mengubah hampir keseluruhan glukosa menjadi asam laktat, sedangkan pada kelompok heterofermentatif tidak hanya menghasilkan asam laktat tetapi juga etanol/asam asetat dan karbon dioksida (Halász, 2009). Yeast merupakan mikroorganisme yang paling efektif dalam menghasilkan etanol. Akan tetapi tidak semua spesies memiliki aktifitas memfermentasi laktosa yang baik bahkan beberapa tidak dapat memfermentasi laktosa dan langsung memfermentasi susu segar untuk menghasilkan etanol (Kurniawati, et al., 2022).

Grain kefir tersusun oleh campuran simbiosis mikroba yang menempel pada matrik apolisakarida, terdiri dari bakteri asam laktat ( $10^8$  CFU/g), *yeast* ( $10^6$ - $10^7$  CFU/g) dan bakteri asam asetat ( $10^5$  CFU/g) (Chen, et al., 2015). BAL terdiri 65-80% dari total populasi mikroba, dengan perbandingan kelompok BAL heterofermentatif dan homofermentatif sebesar (74.5% vs 25.5%). Bakteri asam asetat hanya mewakili 20% dari total populasi mikroba dan biasanya hadir dalam jumlah yang lebih rendah. Jumlah *yeast* yang biasanya lebih sedikit dibandingkan dengan BAL, meskipun pada beberapa biji kefir, *yeast* terhitung dengan persentasi yang lebih besar dibandingkan dengan BAL dari total mikroba (50% vs 31.2%) (Schwan, Magalhães-Guedes and Dias, 2016). BAL yang terdapat di biji kefir diantaranya *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, and *L. kefiranofaciens* adalah spesies yang dominan. Spesies jamur yang dominan pada biji kefir adalah *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Candida kefir*, dan *Kluyveromyces marxianus* ssp., *Marxianus* (Zanirati, et al., 2015).

Terlepas dari asal grain kefir yang berbeda dan metode untuk identifikasi mikroba yang digunakan merupakan faktor yang signifikan dalam mempengaruhi keragaman tersebut (Pogačić, Šinko, Zamberlin and Samaržija, 2013). Tabel 1 menunjukkan diversitas spesies mikroba pada beberapa grain kefir. Terdapat beberapa metode yang telah digunakan untuk menganalisis keragaman mikroba pada grain kefir seperti amplifikasi berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR), pengurutan gen 16S rRNA dan Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Nalbantoglu, et al., 2014, Yegin, et al., 2022, Leite, et al., 2012, Dobson, et al., 2011, Marsh, et al., 2013). Akan tetapi analisis tersebut tidak memberikan gambaran lengkap tentang komunitas mikroba dan mengarah pada hasil yang ambigu karena keterbatasan dan kesalahan yang melekat pada pembuatan profil.

## **KESIMPULAN/PENUTUP**

Grain kefir tersusun oleh campuran simbiosis mikroba yang terdiri dari bakteri asam laktat, *yeast* dan bakteri asam asetat. Diversitas mikroba pada grain kefir dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah: wilayah geografis, mikroba asal, pemeliharaan, kondisi penyimpanan, rasio grain dan susu, waktu dan suhu inkubasi, sanitasi, dan susu yang digunakan. Saat ini diversitas mikroba yang ada pada grain kefir dapat ditunjukkan dengan metode molekuler seperti: amplifikasi berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR), pengurutan gen 16S rRNA dan Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE).

## REFERENSI

- Leite, A. M. d. O., M. A. L. Miguel, R. S. Peixoto, A. S. Rosado, J. T. Silva and V. M. F. Paschoalin. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian journal of microbiology*. 44 (2):341-349.
- Ozcan, T., S. Sahin, A. Akpinar- Bayazit and L. Yilmaz- Ersan. 2019. Assessment of antioxidant capacity by method comparison and amino acid characterisation in buffalo milk kefir. *International Journal of Dairy Technology*. 72 (1):65-73.
- Guzel- seydim, Z., J. T. Wyffels, A. C. Seydim and A. K. Greene. 2005. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*. 58 (1):25-29.
- Dertli, E. and A. H. Çon. 2017. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT-Food Science and Technology*. 85 (-):151-157.
- da Cruz Cabral, L., V. F. Pinto and A. Patriarca. 2013. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International journal of food microbiology*. 166 (1):1-14.
- Karaçalı, R., N. Özdemir and A. H. Çon. 2018. Aromatic and functional aspects of kefir produced using soya milk and Bifidobacterium species. *International Journal of Dairy Technology*. 71 (4):921-933.
- Garrote, G. L., A. G. Abraham and G. L. De Antoni. 2001. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of dairy research*. 68 (4):639-652.
- Witthuhn, R. C., A. Cilliers and T. J. Britz. 2005. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. *Journal of dairy research*. 72 (1):125-128.
- Vardjan, T., P. M. Lorbeg, I. Rogelj and A. Č. Majhenič. 2013. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. *Journal of dairy science*. 96 (5):2729-2736.
- Pogačić, T., S. Šinko, Š. Zamberlin and D. Samaržija. 2013. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*. 63 (1):3-14.
- Cheirsilp, B. and S. Radchabut. 2011. Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens* in mixed cultures with yeasts. *New biotechnology*. 28 (6):574-580.
- Halász, A. 2009. Lactic acid bacteria. *Food quality and standards*. 3 (-):70-82.
- Kurniawati, M., N. Nurliyani, W. Budhijanto and W. Widodo. 2022. Isolation and Identification of Lactose-Degrading Yeasts and Characterisation of Their Fermentation-Related Ability to Produce Ethanol. *Fermentation*. 8 (4):183.
- Chen, Z., J. Shi, X. Yang, B. Nan, Y. Liu and Z. Wang. 2015. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*. 43 (-):15-21.
- Zanirati, D. F., M. Abatemarco Jr, S. H. de Cicco Sandes, J. R. Nicoli, Á. C. Nunes and E. Neumann. 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*. 32 (-):70-76.
- Nalbantoglu, U., A. Cakar, H. Dogan, N. Abaci, D. Ustek, K. Sayood and H. Can. 2014. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food microbiology*. 41 (-):42-51.
- Yegin, Z., M. N. Z. Yurt, B. B. Tasbasi, E. E. Acar, O. Altunbas, S. Ucak, V. C. Ozalp and M. Sudagidan. 2022. Determination of bacterial community structure of Turkish kefir beverages via metagenomic approach. *International Dairy Journal*. 129 (-):105337.
- Leite, A. M., B. Mayo, C. T. Rachid, R. Peixoto, J. Silva, V. Paschoalin and S. Delgado. 2012. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food microbiology*. 31 (2):215-221.

- Dobson, A., O. O'Sullivan, P. D. Cotter, P. Ross and C. Hill. 2011. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS microbiology letters*. 320 (1):56-62.
- Marsh, A. J., O. O'Sullivan, C. Hill, R. P. Ross and P. D. Cotter. 2013. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PloS one*. 8 (7):e69371.
- Wang, X., W. Li, M. Xu, J. Tian and W. Li. 2021. The microbial diversity and biofilm-forming characteristic of two traditional Tibetan kefir grains. *Foods*. 11 (1):12.
- Gao, J., F. Gu, J. He, J. Xiao, Q. Chen, H. Ruan and G. He. 2013. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. *European Food Research and Technology*. 236 (3):549-556.
- Zamperi, N. R., N. E. Mohamad, S. K. Yeap, H. Ky, B. K. Beh, W. C. Liew, S. W. Tan, W. Y. Ho, S. Y. Boo and Y. H. Chua. 2016. 16S metagenomic microbial composition analysis of kefir grain using MEGAN and BaseSpace. *Food Biotechnology*. 30 (3):219-230.