

Bab VI. Hasil dan Pembahasan

VI.1 Hasil Pembuatan Water Kefir

Penelitian ini dilakukan pengujian *Water Kefir* sebagai antioksidan serta dilakukan pengujian aktivitas antiinflamasi. *Water kefir* merupakan minuman fermentasi yang merupakan hasil simbiosis bakteri dan jamur yang menghasilkan produk utama, yaitu: asam laktat, etanol dalam jumlah yang sedikit serta karbondioksida (Deeseenthum dkk., 2018). Pengujian aktivitas antiinflamasi dan antioksidan dilakukan dengan tujuan menentukan aktivitas biologis dari *water kefir* yang bermanfaat bagi kesehatan. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan tujuan mendapatkan nilai IC50 *water kefir* serta pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* dan *in vitro* dilakukan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi *water kefir* serta mekanisme kerja. Hasil pengujian aktivitas *water kefir* dapat dijadikan pilihan makanan fungsional yang bermanfaat bagi kesehatan (Cultureforhealth., 2016).

Pembuatan *water kefir* dibuat dengan cara memasukan bibit kefir ke dalam larutan gula 8% yang merupakan media pertumbuhan kefir serta diberi kismis yang difermentasi pada suhu ruang selama 24-48 jam (Stadie dkk., 2013). Pemberian kismis pada *water kefir* bermanfaat untuk meningkatkan rasa dan aroma yang lebih menarik serta dapat menutupi aroma khas *water kefir*. Pelarut yang digunakan adalah *aqua mineral destilata*, dengan tujuan memperoleh *water kefir* yang baik serta terhindar dari senyawa *chlorin* yang dapat merusak simbiosis bakteri dan jamur pada

water kefir. Media pertumbuhan *water kefir*, larutan gula 8% harus diganti secara rutin dengan pelarut *aqua mineral destilata* dengan tujuan untuk mendapatkan minuman probiotik yang bermanfaat serta terhindar dari cemaran (*Cultureforhealth.*, 2016). Bibit *water kefir* yang diperoleh dari Yogyakarta, sehingga pada proses pembuatannya dilakukan pengadaptasian selama seminggu, untuk mendapatkan hasil *water kefir* yang terbaik dengan suasana dan lingkungan yang sesuai. *Water kefir* yang diperoleh distandarisasi dengan pembanding *water kefir* komersial. *Water kefir* memiliki aroma khas yaitu alkoholik, asetat disebabkan oleh bakteri *Saccharomyces cereviceae* yang menghasilkan enzim *Invertase* dan *Zimase* yang menghasilkan etil alkohol dan CO₂ (Rahmah, 2017).

Tabel. VI.1 Standarisasai *Water kefir* dan *Water kefir* Komersial

No	Standarisasi	<i>Water kefir</i>	<i>Water kefir</i> Komersial
1	Kadar Asam laktat	1,08%	0,98%
2	Kadar Alkohol	0,76%	0,74%
3	pH	4	3,88

Berdasarkan hasil standarisasi diperoleh bahwa pH *water kefir* (pH 4) dengan *water kefir* komersial (3,88). Penurunan pH dapat terjadi karena produk fermentasi *water kefir* yaitu asam laktat dan asetaldehid. Kadar asam laktat *water kefir* (1,08%) sedangkan *water kefir* komersial (0,98%) serta kadar alkohol *water kefir* (0,76%) dan *water kefir* komersial (0,74%), hasil standarisasi *water kefir* dengan *water kefir* komersial tidak berbeda secara signifikan. Standar Nasional Indonesia (SNI) kefir belum ada,

maka disesuaikan dengan produk susu fermentasi lainnya yaitu: yoghurt. Kadar asam laktat memenuhi standar SNI (2009) yaitu 0,5–2,0%, data standarisasi terdapat pada Tabel 6.2 pada lampiran 1. Kadar alkohol, pH dan kadar asam laktat memenuhi standar (Rahman,dkk., 1992).

VI.2 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan *Water Kefir*

Pengujian antioksidan *water kefir* menggunakan sampel *water kefir* yang telah *difreeze-dry*, kemudian dilarutkan dalam metanol P serta diencerkan dengan beberapa konsentrasi. Sampel dilarutkan dalam metanol P dengan tujuan untuk memperoleh data blanko yang sama dengan DPPH yang juga akan dilarutkan dalam metanol P. Pengujian antioksidan dilakukan di ruang gelap untuk mencegah DPPH teroksidasi dengan cahaya (Sayuti, dkk., 2015). Hasil pengujian *water kefir* diperoleh IC₅₀ pada konsentrasi 92,19 ppm serta persen inhibisi pada 100 ppm yaitu: 58,76%. Berdasarkan pengujian *water kefir* nilai IC₅₀ yang diperoleh, maka *water kefir* dapat dikategorikan antioksidan kuat rentang 50-100 ppm (Molyneux., 2004). Vitamin C sebagai standar diperoleh data IC₅₀ sebesar 6,35 ppm serta % Inhibisi Vit-C pada konsentrasi 9 ppm dapat menghambat DPPH sebesar 72,00%. Vitamin C termasuk antioksidan sangat kuat karena menghasilkan IC₅₀ yang kurang dari 50 ppm dapat diamati pada Tabel.II.1.

Tabel VI.2 Perbandingan IC₅₀ *Water kefir* dan Vit-C

Sampel	C (ppm)	% Inhibisi	IC ₅₀
<i>Water Kefir</i>	100,00	58,35%	92,19 ppm
Vitamin C	9,00	72,00%	6,35 ppm

Mekanisme kerja antioksidan dengan cara menghambat oksidasi asam arakidonat menjadi endoperoksida dan menurunkan aktivitas enzim *lipooxygenase*. Apabila oksidasi asam arakhidonat dapat dihambat maka tidak terbentuk oksigen reaktif dan mediator-mediator kimia yang dapat menyebabkan nyeri dan radang, selain itu antioksidan dapat menurunkan aktivitas enzim *lipooxygenase* sehingga tidak menyebabkan terbentuknya leukotrien yang dapat mengaktivasi leukosit yang memacu terjadinya peradangan (Lieber dkk., 1999).

Studi ilmiah mengenai aktivitas antioksidan kefir susu menunjukkan hasil persen inhibisi kefir susu sapi sebesar $77,59 \pm 0,24^*$ kefir beras merah sebesar $85,79 \pm 0,34^*$. Data persen inhibisi diperoleh dari kemampuan kefir menghambat penginduksi kimia yang merupakan radikal bebas, DPPH (Deeseenthum dkk., 2018).

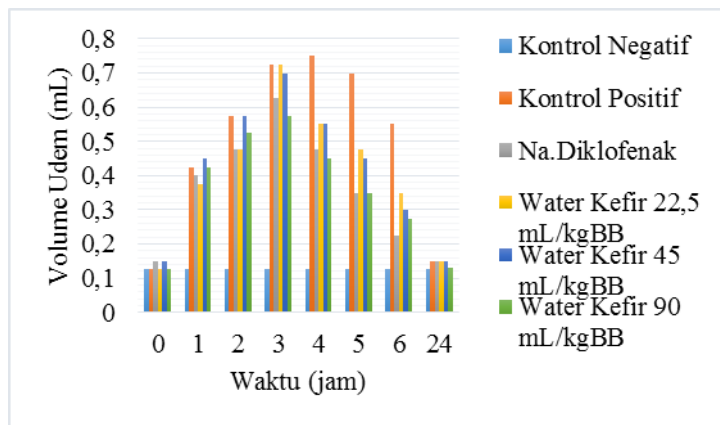
Aktivitas antioksidan yang diberikan oleh *water kefir* terjadi karena *water kefir* dalam proses fermentasinya menghasilkan komponen bioaktif yang berupa *eksopolisakarida* yang berfungsi meningkatkan sistem imun tubuh, menghambat stress oksidatif, mengurangi kerusakan oksidatif, mengurangi produksi *Reactive Oxygen Species (ROS)*. Produksi *eksopolisakarida* dipengaruhi oleh bakteri asam laktat yang terdapat pada *water kefir* (Barboza, dkk., 2018).

VI.3 Hasil Pengujian Aktivitas Antiinflamasi secara *In Vivo*

Pengujian aktivitas antiinflamasi dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro*. Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vivo* dilakukan dengan menggunakan hewan uji yaitu: tikus putih jantan galur Wistar dengan berat badan 150-200 g usia 2-3 bulan. Hewan uji tikus jantan galur Wistar dipilih, dengan tujuan menghindari siklus hormonal seperti: siklus estrus, masa kehamilan dan menyusui yang terjadi pada tikus betina yang dapat mempengaruhi data yang diperoleh pada saat pengujian.

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vivo*, diawali dengan aklimatisasi tikus selama seminggu. Tujuan aklimatisasi dilakukan untuk mengadaptasikan tikus dengan lingkungan yang sesuai untuk menghindari gangguan psikis hewan ketika diberi perlakuan yang dapat mempengaruhi data pengamatan. Pengujian aktivitas antiinflamasi *in vivo water kefir* dibagi atas 6 kelompok yang terdiri dari Kelompok kontrol negatif, kontrol positif, Pembanding (Natrium Diklofenak dosis 4,5 mg/kgBB serta *water kefir* dosis 22,5 mL/kgBB, *water kefir* dosis 45 mL/kgBB, *water kefir* dosis 90 mL/kgBB. Penginduksi udema yang digunakan pada pengujian antiinflamasi ialah Albumin. Tujuan pemberian induktor udema, albumin 5% ialah untuk membuat udema buatan sebagai visualisasi inflamasi akut. Albumin (putih telur) dipilih sebagai induktor udema, karena telah dilakukan orientasi sebelumnya bahwa albumin 5% dapat memberikan efek udema akut yang lebih stabil hingga 6 jam, serta udema yang hilang setelah 24 jam. Keunggulan penginduksi albumin (putih telur) juga bahan penginduksi yang mudah diperoleh, sederhana dan murah.

Pengukuran volume udem digunakan pletismometer. Sebelum pengukuran volume udem, kaki kiri tikus terlebih dahulu diberi tanda dengan tujuan untuk memperoleh data yang selalu konstan setiap kali pengukuran. Rata-rata volume udem dapat diamati pada gambar VI.1. Pada jam ke 3 hingga jam ke 4 terlihat peningkatan volume udem yang merupakan puncak volume udem tertinggi. Hal ini dapat terjadi karena penginduksi merangsang pelepasan mediator inflamasi seperti prostaglandin, bradikinin dan leukotrien, serta terjadi penurunan pada jam ke 6. Pada jam ke 24 volume udem setiap kelompok telah kembali seperti sebelum diinduksi (t_0). Hal ini dapat dijadikan acuan untuk membandingkan kemampuan *water kefir* sebagai antiinflamasi.



Gambar VI.1 Rata-rata Volume Udem setiap Jam

Berdasarkan data statistik *one way ANOVA*, diperoleh data bahwa pada jam ke-4, *water kefir* dosis 22, 5 mL/kgBB dan *water kefir* dosis 45 mL/kgBB menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan dengan kelompok pembanding Natrium Diklofenak 4,5 mg/kgBB.

Water kefir dosis 90 mL/kgBB menunjukkan data adanya perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif serta pembandingan Natrium Diklofenak dosis 4,5 mg/kgBB. Hal ini membuktikan bahwa *water kefir* memiliki efek antiinflamasi dalam hal penurunan udem bahkan pada dosis 22,5 mL/kgBB. Dosis optimum yang direkomendasikan ialah *water kefir* dosis 45 pembandingan hingga jam ke 6 dapat diamati pada Tabel 4.1 pada Lampiran 4. Aktivitas antiinflamasi yang ditimbulkan oleh *water kefir* dipengaruhi oleh komponen bioaktif yang secara tidak langsung dihasilkan pada saat proses fermentasi berlangsung. Peptida bioaktif dihasilkan oleh mikrobiota *kefir* yang mengaktifkan makrofage, sitokin dan menstimulasi sekresi IgG dan IgA oleh limfosit B. Produk fermentasi selama proses fermentasi ialah asam laktat, asam asetat, CO₂, Hidrogen peroksida, etanol, diasetil, bakteriosin (Nogay, dkk., 2019).

VI. 4 Hasil Pengujian Antiinflamasi *Water Kefir* secara *In Vitro*

Pengujian antiinflamasi *water kefir* secara *in vitro* dengan mekanisme kerja stabilisasi membran sel dilakukan dengan prinsip menguji kemampuan stabilisasi membran sel yang diberi larutan hipotonis pada sel darah merah (Kosala, dkk., 2018). Pengujian antiinflamasi secara *in vitro* digunakan sel darah merah karena divisualisasi sebagai membran lisosom. Membran lisosom berpengaruh pada respon inflamasi, karena ketika lisosom pecah maka akan melepaskan enzim dapat memicu terjadinya inflamasi. Kemampuan stabilisasi membran diharapkan dapat menghambat pecahnya basofil yang dapat menimbulkan inflamasi. Stabilisasi

membran eritrosit yang diinduksi larutan hipotonis dijadikan parameter dalam pengujian ini.

VI. 4.1 Hasil Pengujian Antiinflamasi Water Kefir secara *in vitro*

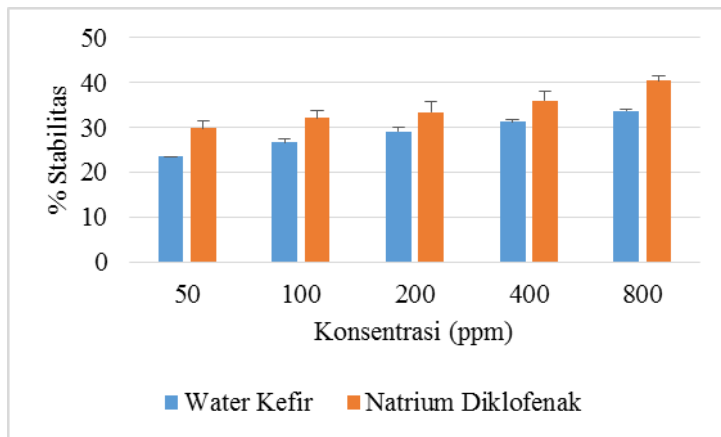
Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dilakukan dengan metode stabilitas membran *Red Blood Cell (RBC)*. Hasil pengujian diperoleh bahwa *water kefir* pada konsentrasi 100 ppm tidak berbeda secara signifikan dengan Natrium Diklofenak 50 ppm, hal ini membuktikan bahwa *water kefir* memiliki aktivitas antiinflamasi dengan mekanisme kerja stabilisasi membran sel serta mampu mencegah basofil pecah sehingga mediator-mediator nyeri tidak lepas sehingga tidak terjadi peradangan (Kosala dkk., 2018).

Water kefir memiliki aktivitas biologis karena terdapat bakteri asam laktat pada saat proses fermentasi berlangsung. Bakteri asam laktat bermanfaat dalam hal meningkatkan nutrisi makanan, mengontrol infeksi pada usus dengan cara memproduksi protein yaitu *bakteriosin*, seperti *nisin* yang dihasilkan oleh *Lactibacillus lactis*, meningkatkan digesti laktosa, mengendalikan tipe kanker, mengendalikan serum kolesterol. Kemampuan *water kefir* dalam hal menjaga stabilitas membran sel diduga dipengaruhi oleh komponen bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat berupa *exopolisakarida* yang dapat menstimulasi sekresi IgA dan IgG oleh limfosit B (Nogay,dkk., 2019).

Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel VI.6 sebagai berikut:

Tabel VI.6 Hasil Persen Stabilitas Water Kefir dan Natrium Diklofenak

Konsentrasi (ppm)	% Stabilitas Na. Diklofenak	% Stabilitas Water Kefir
50	29,770 ± 1,630*	23,450 ± 0,120*
100	32,160 ± 1,620	26,650 ± 0,911
200	33,410 ± 2,480	29,121 ± 0,809
400	36,050 ± 2,060	31,186 ± 0,669
800	40,500 ± 0,900	33,738 ± 0,305



Gambar VI.2 Grafik Persen Stabilitas Water Kefir