

**LAPORAN
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



UJI AKTIVITAS BEKASAM SEBAGAI ANTIHIPERTENSI (IN VIVO)

OLEH:

Dr. Prima Retno Wikandari M.Si
Prof. Dr. Leny Yuanita, M.Kes

NIDN. 0015116402
NIDN. 0012095107

Dilaksanakan dengan Dana BOPTN
Berdasarkan Surat Keputusan Rektor Universitas Negeri Surabaya
Nomor: 095/UN38/HK/LT/2014 tanggal 24 Februari 2014

KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS NEGERI SURABAYA
TAHUN 2014

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan : Uji Aktivitas Bekasam Sebagai Antihipertensi (in vivo)
Peneliti / Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. PRIMA RETNO WIKANDARI M.Si.
NIDN : 0015116402
Jabatan Fungsional :
Program Studi : Kimia
Nomor HP : 081328262678
Surel (e-mail) : wikandari@yahoo.com
Anggota Peneliti (1)
Nama Lengkap : Prof. Dr. LENY YUANITA M.Kes.
NIDN : 0012095107
Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Surabaya
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra :
Alamat :
Penanggung Jawab :
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp. 70.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp. 140.000.000,00

Mengetahui
Dekan FMIPA Unesa

(Prof. Dr. Suyono, M.Pd)
NIP/NIK 196006201985031003

Surabaya, 27 - 11 - 2014,
Ketua Peneliti,

(Dr. PRIMA RETNO WIKANDARI M.Si.)
NIP/NIK 196411151991032001

Menyetujui,
Kepala LPPM Unesa

(Prof. Dr. I Wayan Susila, M.T.)
NIP/NIK 195312151980021002

RINGKASAN

Penelitian ini adalah bagian dari road map penelitian yang merupakan kelanjutan dari penelitian disertasi dan bertujuan untuk mengetahui potensi bekasam (produk fermentasi ikan) sebagai pangan antihipertensi yang dilakukan selama 2 tahun. Dari penelitian disertasi telah diketahui bahwa bekasam mempunyai kemampuan sebagai Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitor (*in vitro*) yang merupakan peptida yang dihasilkan akibat degradasi proteolitik bakteri asam laktat (BAL) selama fermentasi. ACE adalah enzim yang berperan terhadap terjadinya hipertensi, sehingga penghambatan terhadap aktivitas enzim ACE akan mencegah hipertensi. Telah didapatkan juga BAL proteolitik yang menghasilkan peptida dengan aktivitas ACE inhibitor yang tinggi, yang selanjutnya digunakan sebagai kultur starter pembuatan bekasam dalam penelitian ini. Masih diperlukan penelitian untuk uji antihipertensi *in vivo*, mengingat bekasam dikonsumsi dan untuk menjalankan fungsinya peptida ACE inhibitor harus stabil terhadap degradasi enzim-enzim pencernaan.

Penelitian ini adalah penelitian Tahun I yang bertujuan (1) untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bekasam dalam menurunkan tekanan darah sistol (TDS) tikus hipertensi, dan (2) mengetahui stabilitas peptida ACE inhibitor terhadap degradasi enzim pencernaan pepsin dan tripsin. Terdapat 3 kelompok perlakuan yaitu kelompok dengan pemberian ekstrak bekasam dengan konsentrasi peptida 10 mg/kg per berat tikus (P1); 50 mg/kg (P2) dan 100 mg/kg (P3). Kelompok kontrol (K) adalah tikus yang hanya diberi larutan garam dengan konsentrasi garam sama dengan kadar garam pada bekasam yaitu 5%. Pemberian ekstrak dilakukan secara *gastric intubation* secara *single oral* dan secara kontinyu selama 10 hari. Pengukuran tekanan darah dilakukan dengan metode *tail-cuff method* dan diukur pada jam ke 2, 4, 6 dan 8 pada perlakuan secara *single oral*, dan pada hari ke 2,4,7 dan 10 dan pada hari ke 5-10 setelah penghentian pemberian ekstrak pada perlakuan secara kontinyu. Tikus yang digunakan usia 17-20 minggu dengan berat badan 280-320gr. Sebelum perlakuan, tikus dibuat hipertensi dengan pemberian NaCl dan pretnison selama 2 minggu. Pada tahun I ini juga dilakukan pengujian stabilitas peptide antihipertensi pada ekstrak bekasam akibat degradasi enzim pencernaan secara *in vitro*. Stabilitas peptide diukur melalui jumlah peptida dan aktivitasnya sebagai ACE inhibitor setelah ekstrak bekasam didegradasi lebih lanjut oleh enzim pepsin, dilanjutkan dengan enzim tripsin secara *in vitro*. Proses pembuatan bekasam dilakukan dengan penambahan kultur starter *L.plantarum* B1765 dan difermentasi selama 5 hari pada suhu ruang, ratio ikan dan nasi 1:1, dan kadar garam 5%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi peptida, semakin besar penurunan tekanan systole yang dihasilkan. Pemberian ekstrak bekasam secara *single oral* mampu menunjukkan penurunan tekanan sistol tikus hipertensi setelah 2 jam perlakuan dan terus menunjukkan penurunan hingga jam ke 6, dengan penurunan maksimal sebesar - 62,8 mmHg dengan pemberian konsentrasi peptida sebesar 100 mg/kg. Tekanan sistole selanjutnya meningkat kembali sebesar 12 mmHg setelah 8 jam perlakuan.

Pemberian peptida pada ekstrak bekasam secara kontinyu selama 10 hari

dengan konsentrasi peptida 10 mg/kg menurunkan tekanan systole hingga mencapai 174 mmHg dan relative stabil hingga 10 hari setelah penghentian pemberian ekstrak bekasam. Pada perlakuan 50mg/kg mampu menurunkan TDS hingga 146 mmHg, akan tetapi menunjukkan peningkatan ± 5 mmHg setelah 6-10 hari dari penghentian ekstrak bekasam, sedangkan pemberian ekstrak bekasam dengan konsentrasi peptida sebesar 100 mg/kg selama 10 hari berturut-turut mampu menurunkan tekanan sistol sebesar -106 mmHg hingga rata-rata tekanan darah systole mencapai 110 mmHg, akan tetapi TDS kembali meningkat sebesar ± 10 mmHg pada hari ke 5 setelah penghentian pemberian ekstrak dan terus meningkat sebesar ± 20 mmHg pada hari ke 10 setelah penghentian pemberian ekstrak bekasam.

Peptida dalam ekstrak bekasam diketahui bersifat resisten terhadap hidrolisis pepsin dan tripsin yang diketahui dari jumlah peptida yang relative sama baik sebelum maupun sesudah hidrolisis dengan enzim pepsin dan tripsin. Stabilitas sebagai ACE inhibitor juga relative tetap (69.87% - 71.5%), yang berarti peptida ACE inhibitor tidak mengalami perubahan struktur akibat hidrolisis enzim pepsin dan tripsin.

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah swt, akhirnya penelitian dengan judul Uji Aktivitas Bekasam Sebagai Antihipertensi (*in vivo*) akhirnya dapat terselesaikan. Penelitian ini dilakukan sebagai tindak lanjut dari hasil penelitian Disertasi yang mempelajari potensi bekasam sebagai antihipertensi mengingat saat ini jenis makanan tradisional ini sudah mulai punah dan tidak lagi dikenal oleh masyarakat luas. Dengan serangkaian penelitian dalam lingkup Road Map yang telah dibuat, maka hasil2 penelitian diharapkan dapat meningkatkan citra bekasam dengan adanya nilai tambah potensinya sebagai pangan fungsional antihipertensi dan diharapkan bisa memasuki pasar yang lebih luas.

Pada kesempatan ini kami sampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ketua Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan dana melalui Penelitian Fundamental 2014 (Tahun I dari 2 tahun penelitian)
2. Ketua Lembaga Penelitian Unesa, atas kesempatan yang telah diberikan untuk melaksanakan penelitian ini.
3. Dekan FMIPA Universitas Negeri Surabaya, atas dukungan yang telah diberikan.
4. Kepala Laboratorium Universitas Surabaya, yang telah memberikan ijin penggunaan fasilitas laboratorium yang kami perlukan.
5. Para Teknisi dan Pembantu Peneliti yang telah bekerja keras demi terselesaikannya penelitian ini.

Kami menyadari masih banyak kekurangan dalam pelaksanaan penelitian ini, oleh sebab itu kami masih membutuhkan kritik dan saran bagi kesempurnaan penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Nopember

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
RINGKASAN.....	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Urgensi Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Peptida Antihipertensi.....	5
2.2 ACE dan Hipertensi.....	9
2.3 Bakteri Asam Laktat dan Peptida Antihipertensi	13
2.4 Pencernaan Protein dalam Saluran Pencernakan	15
2.5 Bekasam.....	16
2.6 Hasil Penelitian Tekait.....	20
2.7 Road map Penelitian.....	23
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1 Tujuan Penelitian.....	24
3.2 Manfaat Penelitian.....	24
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 Tahap Penelitian.....	25
4.2 Rancangan Penelitian.....	25
4.3 Defenisi Operasional.....	26
4.4 Prosedur Penelitian.....	27
4.5 Teknik Analisis Data.....	30
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Tahap Persiapan.....	31
5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Bekasam Terhadap Tekanan Sistol	32
5.3 Stabilitas Peptida Antihipertensi.....	37
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....	41
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	
1. Artikel Seminar Nasional	
2. Sertifikat Sebagai Pemakalah Pada Seminar Nasional	
3. Draft artikel jurnal yang sudah submit sampai pada revisi dari jurnal terakreditasi Agritech, Fakultas Teknologi Pertanian-UGM.	

DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel	Halaman
2.1	Pengaruh Peptida Antihipertensi Pada Penu- runan Tekanan Darah	8
2.2	Jenis Bakteri Asam Laktat pada Produk Serupa Bekasam	19
5.1	Konsentrasi Peptida Ekstrak Bekasam Dengan Titration Formol	32
5.2	Jumlah Peptida Hasil Degradasi Ekstrak Bekasam Oleh Enzim Pepsin dan Tripsin	38
5.3	Data Aktivitas ACE Inhibitor Ekstrak Bekasam Akibat Degradasi Enzim Pencernakan	40

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
2.1	Renin-Angiotensin-Aldosteron System	11
2.2	Bekasam Yang Dijual di Pasaran	18
2.3	Road Map Penelitian	23
5.1	Koloni <i>L.plantarum</i> B1765	31
5.2	Pengaruh Pemberian Ekstrak Bekasam Sesaat Pada Penurunan TDS Tikus Hipertensi	33
5.3	Pengaruh Pemberian Ekstrak Bekasam SecaraKontinu Pada Penurunan TDS Tikus Hipertensi	35

DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Gambar	Halaman
1	Dokumentasi Proses Pembuatan Bekasam	49
2	Data TDS Persiapan Tikus Hipertensi	50
3	Data TDS Pada Perlakuan Se saat	51
4	Data TDS Pada Perlakuan Kontinu	52
5	Absorbansi Pada Panjang Gelombang 228 nm	53

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Bekasam adalah salah satu jenis produk fermentasi ikan dengan campuran garam dan nasi. Sebagai salah satu jenis makanan tradisional Indonesia, jenis makanan ini hampir tidak lagi dikenal oleh masyarakat umum, padahal makanan sejenis bekasam seperti *plachom* (Thailand), *burong isda* (Philipina) sangat dikenal di negaranya dan telah memasuki pasaran International. Hal yang perlu dilakukan untuk mengangkat citra bekasam adalah dengan mengetahui khasiat dan keunggulan bekasam sebagai makanan tradisional.

Dari serangkaian penelitian yang telah dilakukan dalam penelitian disertasi, bekasam diketahui berpotensi sebagai pangan fungsional antihipertensi. Hal ini didasarkan pada hasil penelitian berikut. Bekasam diketahui mempunyai aktivitas sebagai ACE inhibitor secara *in vitro*. ACE adalah enzim yang dapat mengubah peptida Angiotensin I menjadi Angiotensin II dalam sistim Renin Angiotensin, dimana terbentuknya Angiotensin II akan menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah yang dapat menyebabkan hipertensi, sehingga penghambatan terhadap ACE akan mencegah terjadinya hipertensi (Kitts and Weiler, 2003). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas sebagai ACE inhibitor sejalan dengan peningkatan jumlah peptida yang dihasilkan selama proses fermentasi (Wikandari dkk, 2009, 2011a). Peptida yang dihasilkan diduga disebabkan oleh aktivitas proteolitik bakteri asam laktat (BAL) selama proses fermentasi bekasam.

Dari 250 isolat yang diisolasi dari bekasam ditemukan sebanyak 150 isolat yang menunjukkan karakteristik BAL dan 84 isolat menunjukkan aktivitas proteolitiknya dengan aktivitas proteolitik tinggi ditunjukkan oleh 6 isolat BAL yaitu *Lactobacillus plantarum* N2352, *L.plantarum* T2565, *L.plantarum* B1765, *L.plantarum* B1465, *L.pentosus* B2555 dan *Pediococcus pentosaceus* B1661 (Wikandari dkk., 2010, 2012a). BAL proteolitik yang didapatkan ternyata mampu tumbuh pada dan

menunjukkan aktivitas proteolitiknya dalam proses pembuatan bekasam *like product* (Wikandari, dkk 2011b) *L.plantarum* B1765 yang digunakan dalam fermentasi “bekasam like product” diketahui mampu menghasilkan aktivitas ACE inhibitor tertinggi (Wikandari dkk, 2012b).

Dari hasil penelitian tersebut perlu dikaji lebih lanjut beberapa hal untuk memperkuat bukti data tentang potensi bekasam sebagai pangan fungsional antihipertensi. Setelah terbukti dari penelitian pendahuluan bahwa bekasam mampu menunjukkan aktivitasnya sebagai ACE inhibitor secara *in vitro*, masih diperlukan pengkajian lebih lanjut tentang aktivitasnya dalam menurunkan hipertensi secara *in vivo*. Pengujian *in vivo* perlu dilakukan karena masih perlu diketahui apakah ada keterkaitan antara aktivitas bekasam dalam menghasilkan ACE inhibitor dengan aktivitasnya dalam menurunkan tekanan darah systole tikus hipertensi. Oleh sebab itu pada penelitian yang diusulkan ini pada Tahun I akan dilakukan pengujian untuk mengetahui pengaruh pemberian bekasam dalam menurunkan hipertensi secara *in vivo* melalui hewan coba tikus hipertensi. Pengukuran tekanan darah systole dilakukan dengan metode *tail-cuff*.

Sebagai data penunjang maka pada Tahun I juga akan dilakukan penelitian untuk menguji stabilitas peptide antihipertensi pada bekasam terhadap degradasi enzim pencernaan proteolitik. Untuk dapat menjalankan fungsinya sebagai ACE inhibitor *in vivo* maka peptida ACE inhibitor yang dihasilkan pada bekasam harus tidak terdegradasi lebih lanjut oleh enzim pencernaan menjadi peptida yang tidak lagi mempunyai aktivitas ACE inhibitor sehingga tidak dapat menjalankan fungsi antihipertensinya. Untuk mengetahui hal tersebut maka metode yang bisa dilakukan adalah dengan memberikan perlakuan enzim proteolitik pencernaan (pepsin dan tripsin) secara *in vitro* terhadap ekstrak bekasam dan melihat pengaruhnya pada aktivitasnya sebagai ACE inhibitor (*in vitro*). Pengujian aktivitas ACE inhibitor dilakukan dengan mereaksikan ekstrak bekasam dengan ACE dan substrat ACE (peptide Hip-His-Leu) secara *in vitro*. Besarnya aktivitas penghambatan terhadap ACE dilihat dari besarnya asam Hip yang dihasilkan dari reaksi ini. Semakin kecil asam

Hipurat yang dihasilkan, semakin besar aktivitas penghambatannya terhadap ACE.

Hasil penelitian ini digunakan sebagai dasar untuk penelitian tahun ke II yang bertujuan untuk mengetahui karakteristik peptida antihipertensi. Karakteristik dimaksudkan untuk mengetahui sequence asam amino penyusun peptida. Selama ini struktur peptida antihipertensi masih beragam. Penelitian tentang potensi bekasam sebagai agent antihipertensi baru pertama dilakukan dalam rangkaian *road map* penelitian ini, sehingga kebaruan penelitian ini adalah informasi keilmuan tentang potensi bekasam sebagai agent antihipertensi khususnya tentang fungsional bakteri asam laktat dalam menghasilkan peptida antihipertensi dalam fermentasi bekasam. Hasil penelitian ini akan digunakan sebagai dasar dalam pengembangan pangan fungsional bekasam antihipertensi, sebagai upaya pengembangan IPTEK untuk teknologi fermentasi bekasam.

Hasil keseluruhan dari road map penelitian besar ini diharapkan dapat meningkatkan citra bekasam sebagai pangan fungsional antihipertensi dan dapat diproduksi untuk memasuki pasar nasional dan Internasional yang lebih luas.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah pengaruh konsentrasi peptida pada ekstrak bekasam dan waktu inkubasi terhadap penurunan tekanan darah sistol tikus percobaan?
2. Bagaimanakah pengaruh enzim pencernaan (secara *in vitro*) terhadap stabilitas peptide anti hipertensi?

1.3 Urgensi Penelitian

Pangan fungsional terutama untuk antihipertensi saat ini masih terus dieksplorasi dari berbagai sumber. Bekasam berpotensi untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional antihipertensi karena bekasam diketahui mempunyai aktivitas bekasam sebagai ACE inhibitor (*in vitro*). Temuan ini juga ditunjang dengan lainnya tentang jenis bakteri asam laktat proteolitik yang diisolasi bekasam yang diduga sebagai penghasil peptida

yang mempunyai aktivitas sebagai ACE inhibitor dan ditemukannya *L.plantarum* B1765 yang dapat digunakan sebagai kultur starter dan menghasilkan aktivitas ACEI tertinggi. Semua hasil temuan tadi adalah hasil penelitian disertasi, sehingga pada penelitian fundamental ini dilanjutkan untuk mengetahui aktivitas bekasam sebagai antihipertensi (*in vivo*). Penelitian ini perlu dilakukan mengingat bekasam akan dikembangkan sebagai pangan fungsional, sehingga untuk dapat memberikan fungsinya sebagai antihipertensi, maka peptida ACE inhibitor pada bekasam harus resisten terhadap enzim pencernaan, sehingga pada penelitian ini akan dikaji bagaimana pengaruh pemberian bekasam dalam menurunkan tekanan darah sistol tikus hipertensi dan bagaimana stabilitas peptida ACE inhibitor terhadap degradasi proteolitik enzim pencernaan pepsin dan tripsin.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Peptida Antihipertensi

Peptida memainkan peran penting dalam pemenuhan kebutuhan asam amino sebagai sumber nitrogen, akan tetapi penelitian terbaru lebih mengarah pada fungsi sekunder peptida dengan deret asam aminonya yang spesifik yang mempunyai fungsi bioaktif yang memberikan dampak positif pada fungsi dan kondisi tubuh terutama memberikan manfaat pada kesehatan. Aktivitas bioaktif dari beberapa peptida telah diidentifikasi mempunyai berbagai fungsi antara lain sebagai opioid, imonostimulan, antihipertensi, antimikroba, antithrombotik, pengikat logam (Holm, 2003; Meisel, 2005). Peptida yang mempunyai aktivitas biologis ini disebut sebagai peptida biogenik, yang dihasilkan dari hidrolisis enzimatis ataupun proses fermentasi (Yamamoto, *et al.*, 2003). Potensi makanan fermentasi dalam memberikan efek yang menguntungkan telah lama dipelajari. Pada awal abad ini, banyak penelitian diarahkan untuk melihat potensi bakteri asam laktat dalam menunjang gizi, dan kesehatan diantaranya adalah potensi bakteri asam laktat dalam menghasilkan peptida antihipertensi.

Peptida antihipertensi banyak dihasilkan dari protein susu fermentasi, whey dan keju (Korhonen dan Pihlanto, 2003). Seppo, *et al.*, (2003) menemukan bahwa di dalam minuman susu yang difermentasi dengan *Lactobacillus helveticus* LBK – 16H dijumpai peptida biogenik yang dapat menurunkan tekanan darah penderita hipertensi setelah 21 minggu perlakuan. Gobbetti, *et al.*, (2000) juga menemukan peptida pada susu fermentasi yang bersifat sebagai penghambat enzim pengubah Angiotensin I. Peptida ini dihasilkan dari fermentasi oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS 1 dari fragmentasi deret β -casein yang terdiri dari 5 fragmen dan *L.lactis* subsp. *cremosis* FT 4 dengan 3 fragmen β -casein dan 2 fragmen K-casein. Nakamura, *et al.*, (1995) menemukan biogenik peptida antihipertensi dengan deret Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro pada susu fermentasi. Peptida antihipertensi yaitu Tyr-Pro dan Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln yang

ditemukan pada yoghurt dan casein yang difermentasi dengan *Lactobacillus helveticus* CP790. Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln diketahui dapat menurunkan tekanan darah tikus percobaan sampai 31,5 mmHg dengan pemberian secara oral 2mg peptida/kg berat badan (Maeno, *et al.*, 1996; Yamamoto, 1998).

Penelitian peptida antihipertensi pada ikan dan produk olahannya antara lain telah dilakukan oleh Itou dan Akahane, (2004) yang telah menemukan bahwa selama pembuatan *heshiko*, produk fermentasi ikan makarel dijumpai kenaikan peptida pada ekstrak yang diperoleh, dan diketahui dapat menurunkan tekanan darah. Peptida dengan aktivitas antihipertensi juga ditemukan pada otot ikan (Matsufuji, *et al.*, 1994). Ikan makarel yang difermentasi dengan *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus* diketahui juga menghasilkan biogenik peptida antihipertensi (Yin, *et al.*, 2002). Ikan anchovy yang difermentasi dan ikan anchovy yang diasinkan diketahui juga mempunyai aktivitas penghambatan terhadap ACE (Kim, *et al.*, 1993). Kecap ikan dari ikan sardine diketahui mempunyai aktivitas penghambatan terhadap ACE (Yeum, *et al.*, 1993).

Peptida biogenik pada ikan bonito kering yang dikenal dengan *Katsuoobushi* yang dihidrolisis dengan thermolisin juga diketahui dapat menurunkan tekanan darah. Fraksi peptida tersebut adalah Leu-Lys-Pro-Asn-Met (Kouno, *et al.*, 2005). Peptida Leu-Lys-Pro-Asn-Met yang diisolasi dari ikan bonito kering yang dihidrolisis oleh thermolisin menunjukkan efek penghambatan ACE setelah pemberian diet pada binatang percobaan dalam jangka panjang (Yoshikawa, 2000 dalam Wang dan de Meija, 2005).

Salah satu peptida antihipertensi spesifik yang didapatkan dari otot tuna adalah peptida baru dengan urutan Pro-Thr-His-Ile-Lys-Trp-Gly-Asp, urutan asam amino peptida tersebut tidak dijumpai pada protein lainnya. Kaitan antara struktur dan aktivitas peptida tersebut menunjukkan bahwa asam amino pada urutan ketiga yang terakhir dari deret peptida tersebut yaitu triptophan akan mengikatkan peptida ini pada ACE sehingga menghalangi terikatnya substrat biologis pada ACE. Pengujian aktivitas peptida tersebut sebagai inhibitor ACE dari bovine dan paru-paru kelinci menunjukkan peptida

ini mempunyai potensi yang besar dalam menghambat ACE (Kohama *et al.*, 1988 di dalam Kitts dan Weiler, 2003). Peptida dengan penghambatan ACE lebih besar adalah peptida yang lebih pendek dengan residu prolin pada ujung C (Yamamoto, *et al.*, 2003). Hubungan antara struktur peptida dan aktivitas antihipertensi belum sepenuhnya dimengerti, akan tetapi beberapa struktur umum peptida ini antara lain peptida antihipertensi biasanya kaya akan asam amino hidrofobik, dan mempunyai prolin, lisin atau arginin pada ujung C. Peptida-peptida ini juga merupakan peptida pendek dengan 2 sampai 9 asam amino dan sebagian besar merupakan di atau tripeptida yang resistan terhadap enzim pencernaan endopeptidase (Kitts dan Weiler, 2003).

Nateshs *et al.*, 2003 di dalam Meisel, 2005 telah menunjukkan dari studi kristalografi bahwa sisi aktif ACE tidak dapat mengakomodasi peptida-peptida dengan ukuran besar. Peptida antihipertensi dapat berupa peptida pendek dari dipeptida hingga peptida dengan 9 (sembilan) residu asam amino. Dilaporkan bahwa peptida dengan urutan Ala-Pro pada ujung C adalah peptida yang mempunyai efek antihipertensi terbesar dan peptida lebih pendek seperti di dan tri peptida diketahui mempunyai potensi antihipertensi yang lebih baik dibandingkan oligopeptida (Kitts dan Weiler, 2003).

Pengujian lainnya terhadap resistensi peptida ini terhadap enzim pencernaan juga telah dilaporkan. Peptida antihipertensi Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln, yang dihasilkan dari fermentasi susu dengan *L.helveticus* CP790 menunjukkan aktivitas penghambatan yang relatif kecil ($IC_{50} > 1000 \mu M$). Akan tetapi peptida yang lebih pendek Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro yang dihasilkan dari hidrolisis enzim pankreatik peptida induknya menunjukkan aktivitas inhibitor ACE yang relatif lebih tinggi ($IC_{50} = 5 \mu M$) (Yamamoto, *et al.*, 2003).

Masuda *et al.*, (1996) menemukan bahwa tripeptida Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro yang dihasilkan dari susu asam diserap langsung , tanpa dicerna oleh enzim pencernaan, dan ditemukan tetap ada di dalam abdominal aorta dimana peptida-peptida ini dapat menghambat ACE, dan menghasilkan efek antihipertensi pada *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR). Tripeptida

antihipertensi ini tidak ditemukan pada organ lain seperti paru-paru, ginjal, jantung dan otak dan tidak ditemukan pada tikus yang diberi diet saline. Satake *et al.*, 2002 di dalam Yamamoto, *et al.*, 2003 juga melaporkan adanya transport Val-Pro-Pro dapat melintasi sel monolayer CaCo-2 melalui difusi paraseluler.

Fujita dan Yoshikawa, 1999 melakukan studi *in vivo* aktivitas penghambatan terhadap ACE dari peptida antihipertensi yang dihasilkan dari ikan bonito kering. Dari 8 peptida antihipertensi yang dihasilkan, peptida Leu-Lys-Pro-Asp-Meth yang dihidrolisis menghasilkan Leu-Lys-Pro memberikan nilai penurunan tekanan sistole 8 kali lipat lebih tinggi dibandingkan peptida induknya. Pemberian secara oral peptida Leu-Lys-Pro-Asp-Meth dan Leu-Lys-Pro menunjukkan efektivitas penghambatan yang lebih tinggi dibandingkan Captopril suatu antihipertensi sintetis. Penelitian yang dilakukan pada penderita hipertensi yang melibatkan 30 subyek sampai 8 minggu mampu menurunkan tekanan darah 60-66% dengan pemberian makan bonito kering yang dihidrolisis dengan thermolisin.

Tabel 2. Pengaruh Peptida Antihipertensi Pada Penurunan Tekanan Darah

No	Peptida	Sumber	Preparasi	Penurunan Tek.Sistole	Referensi
1.	Val-Val-Pro-Phe-Pro-Gly	casein	Proteinase	-22	Matsumura, <i>et al.</i> , 1993
2.	Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg	casein	Tripsin	-10.0	Kohmura, <i>et al.</i> , 1989
3.	Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro	casein	enzym pencernaan	-32.2	Fujita, <i>et al.</i> , 1999
4.	Val-Pro-Pro	casein	Fermentasi	-20	Nakamura,

					<i>et al.</i> , 1995
5.	Tyr-Pro	casein	Fermentasi	-27.4	Yamamoto, 1999
6.	Ile-Pro-Pro	Susu asam	Fermentasi	-21	Sipola et al., 2002
6.	His-His- Leu	kedelai	Fermentasi	-32	Shin ZI, <i>et al.</i> , 2001
7.	Leu-Lys-Pro	bonito	Thermolisin	-50	Fujita dan Yoshikawa, 1999.

Sumber: Yamamoto *et al.*, 2005 , FitzGerald, *et al.*, 2004 dan Kitts dan Weiler, 2003.

2.2 ACE Dan Hipertensi

Menurut rekomendasi dari *Joint National Committee of Prevention, Detection, Evalution, and Treatment of High Blood Pressure* (JNC VII), kondisi tekanan darah dibagi dalam 4 katagori yaitu : (i) normal, jika tekanan darah sistole < 120 mm Hg dan tekanan darah diastole < 80 mm Hg; (ii) prehipertensi, jika tekanan darah sistole 120-139 mm Hg dan tekanan darah diastole 80-90 mm Hg; (iii) hipertensi tingkat I, jika tekanan darah sistole 140-159 mm Hg, dan tekanan darah diastole 90-99 mm Hg; (iv) hipertensi tingkat II, jika tekanan darah sistole > atau = 160 mmHg dan tekanan darah diastole > atau = 100 mm Hg (National Hearth, Lung, and Blood Institute, 2003 dalam FirtzGerald, *et al.*, 2004).

Hipertensi terjadi karena adanya kenaikan pada *cardiac output* dan kenaikan pada *systemic vascular resistance*, atau dipengaruhi oleh keduanya. Terdapat dua golongan hipertensi yaitu hipertensi essensial atau primer dan hipertensi sekunder. Sekitar 95% hipertensi disebabkan oleh hipertensi primer yaitu hipertensi yang disebabkan oleh multifaktor dan tidak diketahui penyebabnya, dan 5% disebabkan oleh hipertensi sekunder

yang terjadi karena kerusakan organ, gaya hidup dan penggunaan obat-obatan. (Sharma dan Kortas. 2007).

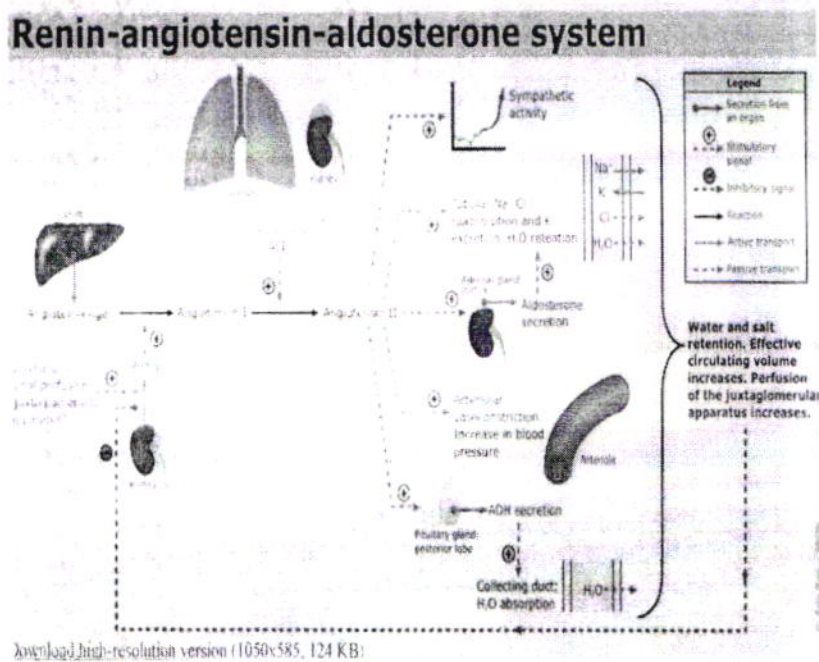
Walaupun belum diketahui secara pasti penyebabnya akan tetapi hipertensi primer biasanya terjadi berkaitan dengan tingginya asupan garam (lebih dari 5 8 gr perhari), usia, obesitas, genetik dan kerusakan ginjal. 30% hipertensi primer disebabkan oleh genetik. Gen hipertensi belum dapat diidentifikasi, akan tetapi penelitian terbaru pada gen hipertensi ini difokuskan pada faktor-faktor genetik yang mempengaruhi renin-angiotensin-aldosteron system (RAAS) (Anonim , 2007 a). Beberapa penyebab terjadinya hipertensi sekunder adalah : *renal artery stenosis, chronic renal disease, prymary hyperaldosteronism, sleep apnea, hyper atau hypothyroidism, pheochromocytoma, preeclamsia, aortic coarction* (Klabunde. 2007). Beberapa faktor ini juga berkait dengan adanya ACE yang terdapat pada RAAS.

Mekanisme sistim Renin-Angiotensin-Aldosteron terjadi jika terjadi penurunan tekanan darah di dalam ginjal menurun yang antara lain diakibatkan oleh renal artery stenosis. Pada keadaan ini maka sel-sel juxtaglomerular pada ginjal akan mensekresikan enzim renin yang akan memecah angiotensinogen yang disekresikan oleh hati menghasilkan angiotensin I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu). 2 residu terakhir angiotensin I akan diputus dengan aksi hidrolitik ACE (dikeluarkan oleh paru-paru) membentuk angiotensin II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) yang merupakan vasopresor yang kuat.

Angiotensin II meningkatkan tekanan darah dengan memberikan berbagai pengaruh di dalam tubuh. Angiotensin II dapat mengerutkan otot-otot halus dinding pembuluh darah sehingga menyebabkan meningkatnya tekanan darah dan menghambat aliran darah. Angiotensin II juga akan mempengaruhi *adrenal cortex* memacu sekresi aldosteron. Aldosteron berperan pada tubulus pada ginjal, menyebabkan tubulus-tubulus ini melakukan reabsorsi sodium dan air dari urine dan mensekresikan potasium untuk menggantikan sodium, sehingga terjadi retensi garam dan air yang

mengakibatkan volume sirkulasi darah efektif meningkat dan perfusi jugtaglomelular juga meningkat. Angiotensin II juga akan menstimulasi pembebasan Anti Diuretic Hormone (ADH) dari kelenjar pituari yang akan meningkatkan jumlah fluida di dalam darah, meningkatkan volume darah dan meningkatkan tekanan darah.

Salah satu faktor penyebab hipertensi karena kerusakan ginjal (*renal hypertension*) adalah penyempitan arteri yang mensupply darah ke ginjal (*renal artery*). Pada penderita usia muda terutama wanita, penyempitan ini disebabkan oleh penebalan otot –otot dinding arteri yang menuju ke ginjal (*fibromuscular hyperplasia*). Pada usia tua, penyempitan *renal artery* lebih banyak disebabkan oleh *plaque* yang mengandung lemak (*atherosclerotic*) yang menutup *renal artery*.



Gambar 2.1. Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Sumber: Anonim , 2007 b

Penyempitan *renal artery* akan mengganggu sirkulasi darah pada ginjal. Pengurangan aliran darah ini selanjutnya akan menstimulasi renin-angiotensin-aldosteron sistem. Penurunan tekanan pada arteriol dan penurunan renal perfusion akan menstimulasi pengeluaran renin oleh ginjal

yang akan menstimulasi peningkatan sirkulasi Angiotensin II dan aldosteron. Angiotensin II menyebabkan pengerutan (*vasoconstriction*) dan peningkatan kekakuan *peripheral artery* dan memperkuat aktivitas syaraf simpatik. Pengaruh lainnya dengan adanya angiotensin II dalam menstimulasi pengeluaran Hormon aldosteron akan meningkatkan volume darah dengan meningkatkan reabsorpsi Na dan air. Efek keseluruhan dari mekanisme ini adalah adanya kenaikan volume darah yang akan menambah *cardiac output*, sehingga renal artery stenosis akan menyebabkan hipertensi sebagai hasil adanya *systemic vascular resistance* dan adanya kenaikan *cardiac output*.

Kerusakan patologi nephron pada ginjal, akan menyebabkan ginjal tidak dapat mengekskresikan Na dalam jumlah normal sehingga akan mendorong terjadinya retensi Na dan air dalam darah yang akan meningkatkan volume darah dan lebih lanjut meningkatkan *cardiac output*. Sistem ini tentunya terjadi dengan adanya stimulasi renin –angiotensin-aldosteron. Meningkatnya tekanan arteri dapat dilihat sebagai upaya ginjal untuk meningkatkan renal perfusi dan fungsi filtrasi glomerular dapat berjalan normal kembali.

Tekanan emosional juga menjadi salah satu penyebab terjadinya hipertensi sekunder. *Stress* akan mendorong peningkatan aktivitas sistem syaraf simpatik yang menyebabkan pembebasan norepinephrine dari syaraf simpatik di dalam hati dan pembuluh darah, sehingga menyebabkan peningkatan *cardiac output* dan *vascular resistance*. Lebih lanjut adrenal medulla akan mengsekresikan lebih banyak catecholamine (epinephrine dan norepinephrine). Aktivasi sistem syaraf simpatik akan meningkatkan sirkulasi angiotensin II, aldosteron, yang akan meningkatkan *vascular resistance* dan lebih lanjut akan menyebabkan terjadinya hipertensi. Adanya peningkatan Angiotensin II dan catecholamin yang berkepanjangan akan dapat menyebabkan *hypertrophy cardiac dan vascular*

Tumor pada kelenjar adrenal juga dapat merupakan penyebab hipertensi sekunder. Tumor ini akan menyebabkan produksi hormon

adrenalin berlebih yang akan menyebabkan hipertensi. Adanya tumor pada adrenalin akan menyebabkan produksi aldosteron berlebih (*hyperaldosteronism*) yang akan mengakibatkan terjadinya retensi Na di dalam darah sebagai pengganti dilepaskannya kalium ke dalam urine sehingga akan meningkatkan tekanan darah.

Penyempitan segmen aorta (*coarctation*), arteri utama pada jantung, juga menjadi salah satu penyebab hipertensi. *Coarctation* adalah kelainan menurun yang jarang terjadi yang menjadi penyebab terjadinya hipertensi pada anak-anak. Aorta akan mengirimkan darah ke arteri yang mensupply darah ke seluruh organ termasuk ginjal, sehingga penyempitan segmen aorta juga akan mengakibatkan penurunan aliran darah pada ginjal yang selanjutnya juga akan menstimulasi berjalannya sistim renin-angiotensin-aldosteron.

Faktor-faktor genetik memainkan peranan penting yang menjadi penyebab terjadinya "*metabolic syndrome*" Seseorang dengan *metabolic syndrome* mempunyai *insulin resistance* dan cenderung mengalami diabetes mellitus type 2. Kegemukan akan cenderung meningkatkan kadar gula darah (*hyperglycemia*), peningkatan lipida darah, inflamasi vaskuler, reaktivitas abnormal pembuluh darah, dan hipertensi yang kesemuanya ini akan memicu terjadinya *atherosclerotic vasculer*.

2.3 Bakteri Asam Laktat dan Peptida Antihipertensi.

Beberapa strain bakteri asam laktat telah diteliti mampu menghasilkan peptida yang mampu menghambat aktivitas ACE pada beberapa sumber protein bahan pangan seperti susu, telur, ikan, jagung dan kedelai. Penelitian telah banyak dilakukan terutama pada substrat susu.

Penemuan pertama adanya peptida ACE inhibitor sebagai hasil aktivitas bakteri asam laktat pada susu ditemukan pada susu yang difermentasi dengan kombinasi *Lb. helveticus* CP790 and a *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan dua jenis peptida antihipertensi Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro yang juga menunjukkan aktivitas antihipertensi secara in vivo

(Nakamura *et al.*, 1995). Susu yang difermentasi dengan *Lb. helveticus* LBK 16H, R211, R398, LMG 11474 juga menghasilkan peptida antihipertensi (Tuomilehto, *et al.*, 2004; Leclerc, *et al.*, 2002 dalam Fandino, *et al.*, 2006 ; Vermeirssen, *et al.*, 2003). Pada kenyataannya *Lb. helveticus* efektif dalam menghasilkan peptida antihipertensi disebabkan karena bakteri ini mempunyai aktivitas proteolitik yang lebih tinggi dibandingkan jenis BAL lainnya.

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa dari 231 mikroorganisme yang diisolasi dari susu mentah, empat strain *Enterococcus faecalis* diketahui juga dapat menghasilkan peptida ACE inhibitor dan mampu menurunkan tekanan darah tikus hipertensi (Muguerza, *et al.*, 2006). Penelitian juga telah dilakukan pada strain *Lc. Lactis* dengan substrat susu dan ditemukan bahwa 4 strain *Lc. lactis* mempunyai aktivitas ACE- inhibitor lebih tinggi dibandingkan 7 strain *Lb. helveticus* (Fandino, *et al.*, 2006).

Penelitian tentang strain BAL dalam menghasilkan peptida antihipertensi dengan substrat ikan belum banyak dilakukan, akan tetapi produk fermentasi ikan seperti heshiko, dan kecap ikan, serta beberapa produk fermentasi pada beberapa jenis ikan diketahui mampu menghasilkan peptida antihipertensi. Inokulasi BAL pada ikan yang telah diteliti menghasilkan peptida antihipertensi adalah *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus* dengan substrat ikan makarel (Yin, *et al.*, 2002)

Kemampuan BAL dalam menghasilkan peptida antihipertensi berkaitan dengan sistim proteolitik pada BAL. Sejauh ini belum diketahui secara pasti bagaimana mekanisme proteolitik BAL dalam menghasilkan peptida antihipertensi, walaupun beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui sistim proteolitik BAL dalam menghasilkan senyawa antihipertensi (Fandino, *et al.*, 2006; Algaron, *et al.*, 2004).

Beberapa peptida ACE inhibitor adalah hasil aktivitas proteinase ekstraselluler, contoh fragmen peptida hasil degradasi β -casein dihasilkan

oleh proteinase *Lb.helveticus* CP 790 (Yamamoto, *et al* 1994), sementara peptida antihipertensi lainnya seperti dipeptida Tyr-Pro yang diisolasi dari *yoghurt-like product* yang difermentasi dengan *Lb helveticus* CPN4 adalah hasil degradasi serempak oleh proteinase dan peptidase (Yamamoto, *et al.* 1999). Dipeptida ini kemungkinan dihasilkan dari enzim peptidase Pep X yang menghidrolis ujung C oligopeptide β -casein yang dihasilkan dari hidrolisis awal proteinase ekstraselluler (Pritchard dan Coolbear, 1993).

Proteinase ekstraselluler dari lactococci dan lactobacilli diketahui mempunyai spesifitas terhadap substrat yang sangat luas. Sebagai contoh lebih dari 100 fragmen peptida dihasilkan dari hasil hidrolisis β -casein dengan proteinase tipe P₁ (Juillard *et al.*, 1995 dalam Fandino, 2006). Ikatan peptida pada fraksi 160-170 dan 190-195 dalam β -casein dapat diputuskan oleh semua tipe proteinase, sementara ikatan peptida pada sequence yang lain hanya dapat dihidrolisis oleh beberapa proteinase (Kunji, *et al.*, 1996 dalam Fandino, *et al.*, 2006).

Peptida-peptida pendek yang dihasilkan oleh aktivitas peptidase intraselluler kemungkinan akan disekresikan ke produk melalui semacam pertukaran peptida-peptida ini melalui membran sel (Kunji, *et al*, 1996 dalam Fandino, *et al.*, 2006) atau karena adanya lisis sel yang mengakibatkan intraselluler peptidase keluar dari sel dan akan menghidrolisis peptida-peptida panjang hasil dari degradasi proteinase ekstraseluler. Pada keju, kecenderungan lisis dari sel *Lb helveticus* dan *Lc.lactis* sangat mempengaruhi proses proteolisis (Crow, *et al.*, 1995 dan Valence, *et al.*, 2000 dalam Fandino, *et al.*, 2006).

2.4 Pencernakan Protein Dalam Saluran Pencernakan

Pencernakan makanan diawali dengan pencernaan karbohidrat oleh enzim amilase di dalam mulut. Makanan terdorong masuk ke dalam lambung yang mempunyai pH 2-4, menyebabkan denaturasi protein sehingga dapat terhidrolisis oleh pepsin. Enzim pepsin tergolong dalam protease aspartat, dimana gugus karboksil dari 2 residu asam aspartat penyusunnya merupakan

gugus katalitik pada sisi aktifnya. Pepsin merupakan endopeptidase dan tidak dapat menghidrolisis protein secara total di dalam lambung. Spesifitas pepsin adalah menghidrolisis protein pada residu asam amino aromatis.

Setelah beberapa saat, tergantung pada sifat dan ukuran makanan, makanan akan keluar dari lambung menuju usus halus dimana makanan akan bercampur dengan sekresi pancreas, ginjal maupun mucosa usus yang pada umumnya mempunyai pH sekitar 8. Kondisi ini menyebabkan pepsin menjadi terdenaturasi dan kehilangan aktivitasnya. Di usus semua polimer dalam makanan akan terhidrolisis oleh enzim peptidase, amilase dan lipase.

Jenis enzim proteolitik pada usus meliputi chymotripsin, tripsin, elastase, karboksipeptidase A dan B, dan aminopeptidase leusin. Chymotrisin, tripsin dan elastase adalah endopeptidase yang memotong peptida pada bagian dalam, sedangkan karboksipeptidase dan aminopeptidase leusin adalah eksopeptidase. Tripsin mempunyai spesifitas memotong residu lisin dan arginin, chymotripsin spesifik memotong pada residu tirosin, phenilalanin dan triptopan. dan elastase memotong pada residu alanin. Karboksipeptidase memotong dari ujung C, tetapi tidak dapat memotong residu lisin, arginin atau prolin. Leusin peptidase memotong dari ujung N dan akan berhenti jika terdapat residu prolin.

2.5 Bekasam

Bekasam adalah produk fermentasi laktat dengan bahan dasar ikan dan nasi dengan penambahan garam. Pada dasarnya semua jenis ikan air tawar dapat dibuat untuk bekasam seperti bader, mujair, gabus, betok, tawes dan lain-lain. Bekasam dapat juga dibuat dari bahan dasar udang. Proses fermentasi dapat berlangsung hingga 7 (tujuh) hari dan ikan hasil fermentasi mempunyai sifat fisik seperti ikan segar, berbau asam menyengat, dan beraroma khas bekasam. Untuk dapat dikonsumsi bekasam bisa langsung digoreng atau dimasak dengan dicampur bumbu tertentu seperti pepes ikan.

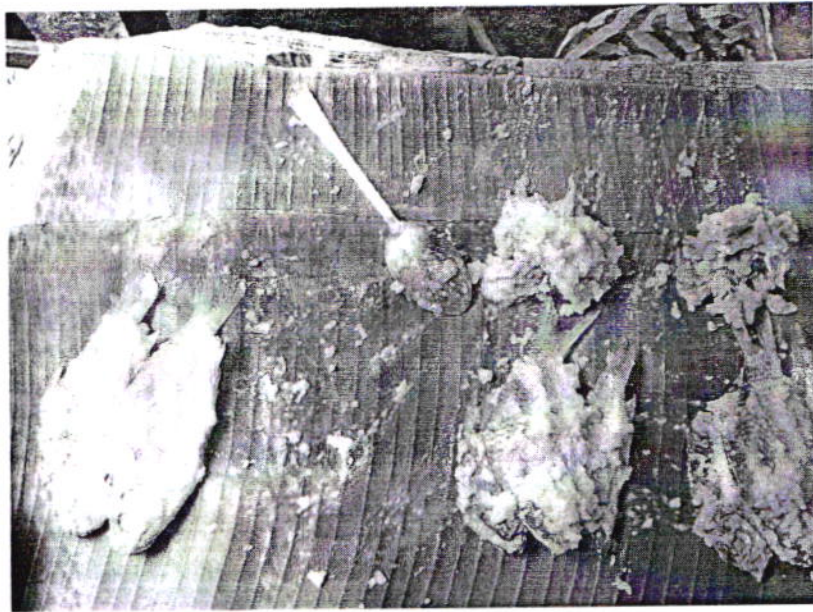
Pambayun. (1995) menyatakan bahwa bekasam memiliki rasa lebih gurih daripada produk segarnya, aman dikonsumsi, dan produk yang

dihasilkan relatif tahan lama. Mikrobial yang aktif selama proses fermentasi bekasam adalah bakteri golongan asam laktat, beberapa genus yeast, kapang dan khamir.

Proses pembuatan bekasam sebenarnya merupakan suatu upaya pengawetan ikan. Garam yang ditambahkan dengan kadar tertentu akan membantu menekan pertumbuhan mikroba pembusuk dan patogen, sedangkan nasi berfungsi sebagai sumber karbohidrat yang selanjutnya diubah oleh yeast menjadi glukosa, selanjutnya glukosa akan diubah oleh bakteri asam laktat menjadi asam laktat yang akan menurunkan pH bekasam sehingga produk menjadi lebih awet dan memberikan cita rasa tertentu khas bekasam.

Hasil survey lapangan di Kecamatan Bungah dan Dukun di Kabupaten Gresik menunjukkan bahwa pada umumnya masyarakat sekitar masih mengenal bekasam. Masyarakat di daerah tepian sungai Bengawan Solo di daerah ini masih sering membuat bekasam untuk dikonsumsi sendiri dalam keluarga, akan tetapi penjual bekasam di daerah ini sudah semakin langka. Dari hasil wawancara dengan penjual maupun masyarakat yang masih sering membuat bekasam diketahui bekasam dibuat dengan bahan dasar yang sama yaitu campuran ikan, garam dan nasi, akan tetapi untuk formula tidak pernah didapatkan takaran yang pasti.

Bekasam dibuat dengan cara ikan segar dibuang sisik, insang dan isi perut, selanjutnya ikan ditambah garam dengan konsentrasi tertentu dan dilakukan fermentasi yang pertama. Proses selanjutnya adalah ikan dicampur nasi dan dilanjutkan dengan proses fermentasi kedua selama lebih kurang 7 (tujuh) hari hingga tercium bau asam khas bekasam.



Gambar 2.2 Bekasam yang dijual di pasaran

Jenis bakteri asam laktat yang tumbuh pada bekasam telah diteliti oleh beberapa peneliti. Yahya, 1995 dalam penelitiannya telah menemukan beberapa jenis bakteri asam laktat pada bekasam ikan mujair dengan kadar garam 10% yaitu *Leuconostoc mesentroides*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. reuteri*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. Lactis*, *L. coryniformis*, *Streptococcus raffinalactis*, *L. delbruechi*, *L. halotoleran*, *L. bifementasi*, *L. toleran*, *L. Bulgaricus*, *Pediococcus acidophilus*, dan *Leuconostoc dextranicum*. Danil, (1999), menemukan jenis bakteri asam laktat *S. thermophilus*, *L. fermentum*, *E. faecium*, *P. acidilactici* dari produk bekasam yang diperoleh dari pasar Banjarmasin, Kalimantan Selatan.

Produk serupa bekasam yang dibuat dari ikan sardine, garam dan glukosa diketahui mengandung *Micrococcus*, *Streptococcus* dan *Pediococcus* sebagai bakteri asam laktat utama yang tumbuh pada produk tersebut. (Ijong, 1995). Jenis-jenis bakteri asam laktat yang tumbuh pada produk serupa bekasam dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Bakteri asam laktat dimanfaatkan dalam industri makanan dengan berbagai tujuan. Asam laktat yang dihasilkan dari degradasi karbohidrat

akan menurunkan pH>4 dimana pH ini cukup berguna dalam menekan sebagian besar mikroorganisme lain termasuk mikroba pembusuk dan patogen, sehingga dapat memperpanjang masa simpan produk hasil fermentasi. Keasaman produk juga dapat mengubah tekstur akibat presipitasi beberapa protein, dan perubahan biokimia lainnya yang menghasilkan cita rasa tertentu khas produk fermentasi.

Tabel 2.2

Jenis Bakteri Asam Laktat pada Produk Serupa Bekasam

No.	Nama produk/ lama fermentasi	Komposisi	Bakteri Asam Laktat
1	Pla-ra 6-10 bln	Ikan, garam, beras sa ngrai	<i>L.farciminis</i> , <i>L.acidipicis</i> , <i>T.halophilus</i> , <i>S.piscifermentans</i>
2	Pla-som 5-7 hr	Ikan, garam, nasi, bw putih/	<i>L.pentosus</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>P.pentosaceus</i> , <i>E.hirae</i>
3	Pla-chom 3-5 hr	Ikan, garam, bw putih, tepung beras sangrai	<i>L.farciminis</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L.acidipicis</i> , <i>S.carnosus</i> , <i>E.hirae</i>
4	Pla-chao 10-20 hr	Ikan, garam, khao-mak	<i>L.fermentum</i>
5	Burong dalag	Ikan, garam, nasi	<i>Leuconostoc mesentroides</i> , <i>P. cereviceae</i> , <i>L.plantarum</i>
5	Burong isda 7 hr	Ikan, garam, nasi	<i>Laktobacillus brevis</i> , s. <i>Faecalis</i> , <i>Leuconostoc mesen troides</i> , Pd. <i>Cereviceae</i> , <i>L.fermentum</i> , <i>L..plantarum</i>

2.6 Hasil penelitian yang telah dilakukan terkait bekasam sebagai antihipertensi

Dari serangkaian penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti adalah bahwa bekasam dari ikan bandeng dan ikan tuna mampu menunjukkan aktivitasnya sebagai ACE inhibitor secara *in vitro* dengan aktivitas penghambatan antara 66 -70% dan bahwa peningkatan aktivitas bekasam sebagai ACE inhibitor juga sejalan dengan peningkatan jumlah peptida (Wikandari dkk, 2009 dan 2011). Hasil hidrolisis protein ikan dengan enzim protease juga menunjukkan aktivitas penghambatan antara 60 – 80% (Bougatef *et al.*, Balti *et al.*, 2010; Jing-na *et al.*, 2010). Hasil lain yang didapat yaitu peningkatan aktivitas penghambatan sejalan dengan peningkatan jumlah peptida yang dihasilkan selama fermentasi. Hal ini juga sesuai dengan hasil penelitian Itou dan Akahane, 2004; Itou *et al.*, 2007 dan Quiros *et al.*, 2007 yang menyatakan bahwa aktivitas ACE inhibitor juga berkorelasi dengan derajat proteolitis pada susu fermentasi.

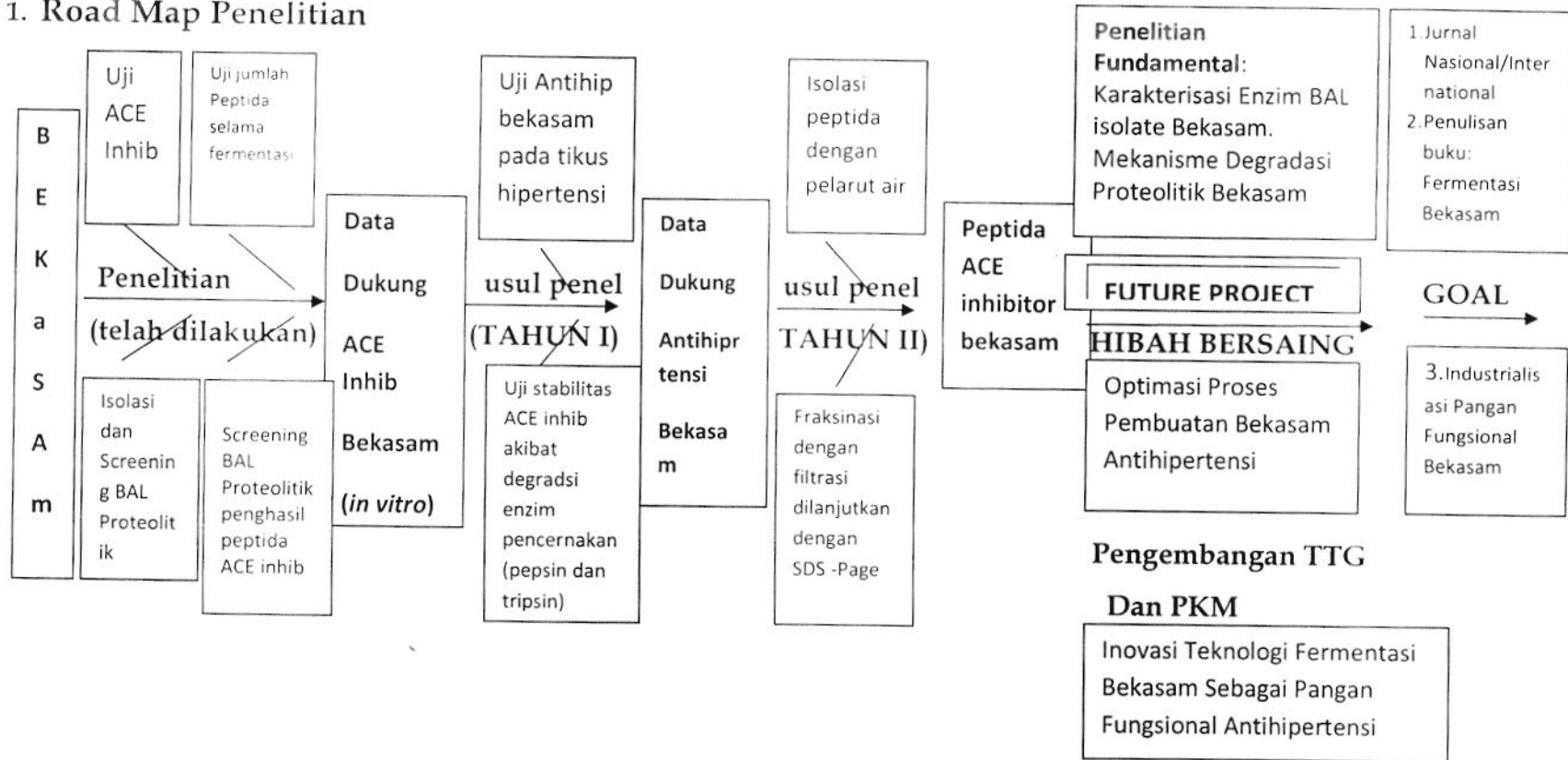
Berdasar hasil penelitian tersebut diduga peptida yang dihasilkan mayoritas dihasilkan oleh aktivitas proteolitik BAL bekasam yang berperan dalam fermentasi bekasam. Oleh sebab itu pada penelitian selanjutnya dilakukan penelitian untuk mengetahui BAL bekasam yang mempunyai aktivitas proteolitik. Hasil penelitian menunjukkan ada 88 isolat BAL bekasam (dari 150 isolat BAL bekasam) yang diketahui mempunyai aktivitas proteolitik yang diuji dengan aktivitas proteolitiknya pada skim milk agar. dan terdapat 6 isolat yang menunjukkan aktivitas proteolitik tinggi (Wikandari *et al.*, 2010). Keenam jenis isolat itu hasil identifikasi dengan API CH 50 yaitu *Lactobacillus plantarum* N2352, *L.plantarum* T2565, *L.plantarum* B1765, *L.plantarum* B1465, *L.pentosus* B2555 dan *Pediococcus pentosaceus* B1661 (Wikandari *et al.*, 2012a). Masin-masing dari keenam isolat yang ditemukan juga telah diuji mampu tumbuh pada media bekasam “like product”, yaitu bekasam yang dibuat dengan cara sterilisasi bahan dasar untuk mengetahui efektivitas kultur tunggal dalam menjalankan aktivitas proteolitiknya (Wikandari *et al.*, 2011) *L.plantarum* B1765 diketahui sebagai isolat yang menghasilkan aktivitas ACE inhibitor

tertinggi dan dalam menghasilkan peptida ACE inhibitor (Wikandari *et al*, 2012b). Pengujian penggunaan *L.plantarum* B1765 sebagai kultur starter dalam proses fermentasi bekasam selanjutnya diketahui mampu menghasilkan aktivitas ACE inhibitor yang lebih tinggi dibandingkan dengan bekasam yang dibuat dengan fermentasi secara spontan (Wikandari *et al.*, 2012c).

Dari serangkaian penelitian ini masih diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pengujian bekasam sebagai antihipertensi. Untuk keperluan ini maka pada penelitian ini dilakukan pengujian *in vivo* yaitu dengan cara pemberian ekstrak bekasam pada tikus hipertensi, yaitu dengan cara mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bekasam dengan beberapa konsentrasi peptida dalam menurunkan tekanan darah sistol tikus hipertensi. Pengukuran tekanan darah dilakukan dengan metode tail-cuff.

Sebagai data penunjang maka juga dilakukan penelitian untuk menguji stabilitas peptide antihipertensi pada bekasam terhadap degradasi enzim pencernaan proteolitik sehingga mampu untuk menurunkan hipertensi. Peptida antihipertensi diketahui mempunyai resistensi terhadap degradasi pepsin (Bougatef *et al*, 2008). Pada penelitian ini akan dikaji lebih lanjut bagaimana pengaruh degradasi pepsin yang merupakan enzim proteinase yang dilanjutkan dengan degradasi enzim tripsin yang merupakan enzim yang akan memecah lebih lanjut hasil degradasi pepsin. Kemungkinan ACE inhibitor pada bekasam memang tidak terdegradasi oleh pepsin karena sudah berupa peptida pendek sehingga tidak lagi dapat didegradasi oleh pepsin, akan tetapi masih perlu dikaji lebih lanjut terhadap degradasi tripsin. Kajian tentang struktur peptida antihipertensi menunjukkan bahwa komposisinya masih beragam, tetapi peptida ACE inhibitor terdiri dari 2-9 residu asam amino dan sebagian besar merupakan di atau tripeptida yang resisten terhadap enzim pencernaan endopeptidase (Kitts dan Weiler, 2003).

1. Road Map Penelitian



Gambar 2.3 Road Map Penelitian