

Pengikatan Garam Empedu oleh Bekasam Bandeng (*Chanos Chanos*) yang Difermentasi dengan *Lactobacillus plantarum* B1765 secara In Vitro

In Vitro Binding of Bile Salt by Bekasam Bandeng Fermented by *Lactobacillus plantarum* B1765

Ika Lailatul Khoiriyah* dan Prima Retno Wikandari

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuam Alam

Universitas Negeri Surabaya, Jl.Ketintang, Surabaya, 60231

*email: ikalailatul26@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bekasam bandeng (*Chanos chanos*) yang difermentasi menggunakan kultur starter *Lactobacillus plantarum* B1765 dalam mengikat garam empedu (in vitro). *Lactobacillus plantarum* B1765 diketahui memiliki aktivitas proteolitik yang dapat mendegradasi protein pada bekasam bandeng menjadi peptida yang diharapkan mampu memberi efek pengikatan pada garam empedu. Jumlah garam empedu yang terikat diukur menggunakan Total Bile Acid (TBA) kit. Bekasam bandeng yang difermentasi pada lama waktu yang berbeda memberikan hasil pengikatan garam empedu yang berbeda. Hasil penelitian menunjukkan kemampuan pengikatan garam empedu terbesar diberikan oleh bekasam bandeng dengan lama waktu fermentasi selama 5 hari, yakni sebesar 27,29%. Untuk lama fermentasi 0, 3, 7, dan 10 hari juga memberikan efek pengikatan pada garam empedu namun dengan persentase yang lebih kecil dibandingkan ekstrak bekasam bandeng yang difermentasi selama 5 hari, yakni 23,17% untuk lama fermentasi 0 hari, 20,28% untuk lama fermentasi 3 hari, 19,88% untuk lama fermentasi 7 hari dan 14,64% untuk lama fermentasi 10 hari.

Kata Kunci: Bekasam bandeng, *Lactobacillus plantarum* B1765, peptida, garam empedu

Abstract. This study is determine the ability of bekasam bandeng (*Chanos Chanos*) fermented by *Lactobacillus plantarum* B1765 to binding bile salts (in vitro). *Lactobacillus plantarum* B1765 known to have proteolytic activity that degrades the protein in bekasam into peptides that are expected to give binding effect on bile salts. The amount of bile salt bound was measured using the Total Bile Acids (TBA) kits. Bekasam fermented at different lengths give results different binding bile salts. The results show the ability of the binding of bile salts by bekasam largest with a long fermentation time for 5 days, which is equal to 27.29%. For a long fermentation 0, 3, 7, and 10 days also give binding effect on bile salts, but by a smaller percentage than bekasam with fermentation time for 5 days, which is 23.17% for 0-day fermentation period, 20.28% for long fermentation 3 days, 19.88% for long fermentation 7 days and 14.64% for the length of fermentation 10 days.

Keywords: Bekasam bandeng, *Lactobacillus plantarum* B1765, peptides, bile salts

PENDAHULUAN

Berdasarkan data WHO tahun 2012, penyebab utama kematian di dunia saat ini adalah penyakit kardiovaskuler, yakni kurang lebih 17,5 juta orang meninggal akibat penyakit kardiovaskuler [1]. Faktor utama penyebab penyakit kardiovaskuler adalah tingginya kadar kolesterol dalam darah sehingga menyebabkan penyempitan pada pembuluh darah [2]. Berdasarkan penelitian, penurunan 1% kadar kolesterol plasma dapat menurunkan risiko kejadian koroner hingga 3%. Penurunan kolesterol dapat dilakukan dengan asupan makanan yang tepat seperti rendah kolesterol, diet rendah lemak, dan yogurt mengandung bakteri asam laktat tertentu [3] Selain itu, mekanisme hipokolesterolemik juga dapat melalui pengikatan garam empedu [4, 5, 6].

Garam empedu berasal dari hasil konjugasi antara asam empedu dengan asam amino glisin atau taurin yang disintesis dalam hati dan disekresikan ke dalam usus. Pengikatan garam empedu akan mengakibatkan berkurangnya jumlah garam empedu yang ada kembali ke hati dan meningkatkan jumlah garam empedu yang diekskresikan melalui feses. Berkurangnya jumlah garam empedu yang kembali ke hati akan memicu hati untuk mensintesi garam empedu yang baru dengan prekursor kolesterol sehingga menyebabkan penurunan kadar kolesterol dalam darah secara tidak langsung [4, 6].

Efek penurunan kolesterol diberikan antara lain oleh peptida yang merupakan hasil degradasi protein, yang ditemukan antara lain pada kedelai, whey dan protein ikan [7]. Beberapa peptida yang berasal dari degradasi protein tersebut diketahui dapat mengikat garam empedu

[8]. Umumnya peptida yang dapat mengikat garam empedu memiliki asam amino hidrofobik pada terminal nitrogennya, sehingga akan bersaing dengan kolesterol untuk berikatan dengan sisi non-polar dari garam empedu dan meningkatkan ekskresi steroid melalui feses [9].

Lactobacillus plantarum B1765 yang telah diisolasi dari bekasam diketahui menunjukkan aktivitas proteolitik sebesar 1,202 Unit/mg, yang mana dapat mendegradasi protein pada bekasam [10]. Degradasi protein oleh enzim proteolitik endogenus maupun mikrobial pada produk fermentasi dapat menghasilkan peptida bioaktif, salah satunya yang telah diteliti adalah peptida *Angiotensin I Convertiny Enzim inhibitor (ACE Inhibitor)* dengan lama waktu fermentasi 5-6 hari [11]. Lama waktu fermentasi bekasam dengan penambahan *Lactobacillus plantarum* B1765 memberikan efek yang berbeda-beda, diantaranya yaitu berpengaruh pada aktivitas proteolitik dari *Lactobacillus plantarum* B1765 sehingga dapat menghasilkan peptida yang berbeda pada lama waktu fermentasi yang berbeda. Penelitian ini akan mengkaji tentang kemampuan bekasam bandeng dengan lama waktu fermentasi yang berbeda dalam mengikat garam empedu.

METODE PENELITIAN

Bahan

MRS Broth (Oxoid), akuademin, Ikan bandeng, *Lactobacillus plantarum* B1765, nasi, garam dapur, larutan buffer fosfat pH 7, *Total Bile Acid (TBA) Kit* (Cellbiolab) dan garam empedu (Oxoid),.

Alat

Neraca analitik, alat gelas, *autoclave* (Hirayama HVE-50), tabung sentrifugasi, alat sentrifugasi (Eppendorf Centrifuge 5810), mikropipet (Transfepette), *blue tip*, pisau, wadah kedap udara, *blender*, kompor listrik, kertas saring, inkubator (Mettler), *Laminar air flow* (UL-US Thermo Fisher Scientific 1386 A2), *Microplate Reader*.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Bekasam Bandeng

Proses pembuatan bekasam bandeng mengacu pada [12]. Bekasam dibuat dari ikan bandeng yang telah dibersihkan sisik, isi perut dan insangnya lalu dilumuri dengan garam sebanyak 5% secara merata, selanjutnya ditempatkan dalam wadah yang berbeda dan diberi label sesuai lama fermentasinya. Ditambahkan nasi dengan rasio ikan : nasi 1:1. Kemudian diinokulasi bakteri *Lactobacillus plantarum* B1765 sebanyak 10^6 CFU/ml dan difermentasi pada suhu ruang selama 3, 5, 7, dan 10 hari.

Ekstraksi Bekasam Bandeng

Ekstraksi bekasam bandeng mengacu pada [13]. Bekasam yang telah difermentasi selanjutnya

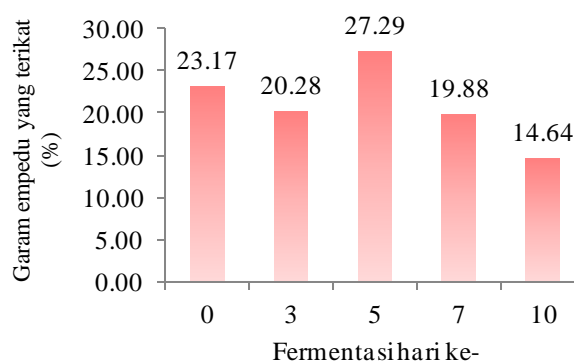
dihomogenasi dengan penambahan akuademin dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan dipanaskan di atas penangas, lalu disaring dan diambil filtratnya yang selanjutnya disebut ekstrak bekasam.

Uji Pengikatan Garam Empedu

Preparasi sampel mengacu pada [14]. Satu milliliter sampel (ekstrak bekasam) ditambah 2.5 ml larutan 0.1 M buffer fosfat pH 7 dan diaduk dengan menggunakan *vortex* hingga tercampur secara sempurna. 100 μ L suspensi sampel dengan konsentrasi yang telah ditentukan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah larutan garam empedu sebanyak 900 μ L. Suspensi selanjutnya diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C dan kemudian disentrifugasi selama 10 menit dan diambil supernatannya. Garam empedu yang terdapat pada supernatan dianalisa dengan *Total Bile Acid* kit yang dilanjutkan dengan pengukuran absorbansi dengan menggunakan *microplate reader* dan hasil yang diperoleh merupakan garam empedu yang tidak terikat yang dinyatakan dalam persen pengikatan (%).

HASIL DAN PEMBAHASAN

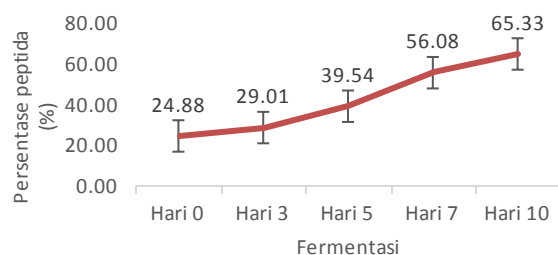
Data pada Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan kemampuan ekstrak bekasam bandeng dengan lama waktu fermentasi yang berbeda dalam mengikat garam empedu dan persentase peptida hasil degradasi protein selama proses fermentasi.



Gambar 1. Pengikatan garam empedu oleh bekasam bandeng yang difermentasi dengan *Lactobacillus plantarum* B1765 dengan lama waktu fermentasi yang berbeda

Pemberian ekstrak bekasam bandeng dengan lama waktu fermentasi yang berbeda memberikan efek pengikatan pada garam empedu. Pengikatan garam empedu terbesar terjadi pada pemberian ekstrak bekasam yang difermentasi selama 5 hari, yaitu sebesar 27,29%, sedangkan pengikatan terendah terjadi pada pemberian ekstrak bekasam bandeng dengan lama waktu fermentasi 10 hari, yaitu sebesar 14,64%. Hasil ini lebih rendah dari

dibandingkan penelitian [14] yang mampu memberikan efek pengikatan garam empedu sebesar 59,04% menggunakan susu kedelai terfermentasi *Lactobacillus plantarum* 1 R.11.1.2.



Gambar 2. Persentase peptida hasil degradasi protein selama proses fermentasi

Pemberian ekstrak bekasam dengan lama waktu yang berbeda dilakukan untuk melihat pengaruhnya terhadap pengikatan garam empedu. Pada waktu fermentasi yang berbeda akan dihasilkan peptida yang berbeda pula. Beragamnya kemampuan ekstrak bekasam bandeng dalam mengikat garam empedu ini diduga berkaitan dengan struktur kimia dan sifat ionik peptida yang dihasilkan akibat aktivitas proteolitik dari *Lactobacillus plantarum* B1765 selama proses fermentasi yang menyebabkan protein pada bekasam bandeng terdegradasi menjadi peptida berukuran lebih kecil.

Dari Gambar 1 dapat dilihat pada lama fermentasi 0 hari, ekstrak bekasam bandeng sudah mampu memberikan efek pengikatan garam empedu sebesar 23,17% sedangkan pada lama fermentasi 3 hari efek pengikatan yang diberikan menurun menjadi sebesar 20,28%. Hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak bekasam bandeng yang difermentasi selama 0 hari, sudah ada protein atau peptida yang memiliki kemampuan untuk mengikat garam empedu. Pada fermentasi 3 hari, protein yang ada dalam bekasam mulai terdegradasi yang menyebabkan protein atau peptida yang memiliki kemampuan pengikat garam empedu juga ikut terdegradasi dan mengakibatkan kemampuan pengikatannya mengalami penurunan.

Pada lama fermentasi 5 hari, efek pengikatan garam empedu yang diberikan oleh ekstrak bekasam bandeng mengalami peningkatan dibandingkan pada lama fermentasi sebelumnya, yakni mencapai 27,29% dan ini merupakan persentase pengikatan terbesar. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya peptida pengikat garam empedu yang kembali terbentuk akibat aktivitas proteolitik dari *Lactobacillus plantarum* B1765.

Pada lama fermentasi 7 hari dan 10 hari, kemampuan pengikatan garam empedu kembali mengalami penurunan, yakni menjadi 19,88% dan 14,64%, yang

diduga diakibatkan karena protein pada bekasam terpecah menjadi ukuran-ukuran yang lebih kecil, seperti ditunjukkan pada Gambar 2, akibat dari aktivitas proteolitik dari *Lactobacillus plantarum* B1765 yang bertambah besar seiring dengan bertambahnya lama waktu fermentasi, sehingga terjadi pemecahan lebih lanjut dari peptida yang ada dalam bekasam bandeng termasuk peptida yang mempunyai kemampuan pengikat garam empedu, sehingga kemampuan pengikatannya juga ikut mengalami penurunan.

Rendahnya kemampuan pengikatan garam empedu oleh bekasam bandeng dibandingkan dengan susu kedelai terfermentasi yang telah diteliti oleh Yusmarini disebabkan oleh perbedaan jenis peptida yang terdapat dalam produk tersebut. Perbedaan jenis protein yang didegradasi maupun jenis enzim protease yang digunakan dapat menyebabkan perbedaan jenis peptida yang dihasilkan. Enzim protease mempunyai spesifisitas yang berbeda, dimana dia dapat memecah protein pada tempat yang berbeda sehingga menghasilkan peptida yang berbeda pula. Pola pemecahan dan derajat hidrolisa mempengaruhi peptida bioaktif yang dihasilkan [15]. Namun pada penelitian ini belum dilakukan penelitian lebih lanjut tentang jenis peptida yang terkandung dalam ekstrak bekasam yang difermentasi selama 5 hari, sehingga belum dapat diketahui jenis peptida yang dapat menyebabkan ekstrak bekasam bandeng memiliki kemampuan pengikatan garam empedu.

KESIMPULAN

Lactobacillus plantarum B1765 yang diinokulasikan pada bekasam bandeng diketahui memiliki kemampuan dalam membentuk peptida bioaktif yang bersifat mengikat garam empedu. Kemampuan pengikatan garam empedu terbesar diberikan oleh lama waktu fermentasi 5 hari, yakni dengan kemampuan pengikatan sebesar 27,29%.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait optimalisasi produksi peptida bioaktif dari bekasam bandeng yang difermentasi dengan *Lactobacillus plantarum* B1765 yang memiliki kemampuan dalam mengikat garam empedu.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO, 2015. Cardiovascular diseases (CVDs), Fact sheet No.317, updated January 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/#>. Diakses pada 24 Februari 2015
2. Krummel, D.A. 2008. Medical nutrition therapy for cardiovascular disease. *Krause's Food and Nutrition Therapy, 12th ed*, 833-864

3. Jeun, Jungae; Sukyung, Kim; Yun, Cho Sung; Jin, Jun Hee; Jin, Park Hyun; Gu, Seo Jae; Jun, Chung Myung; and Joon, Lee Sung Joon. 2010. Hypocholesterolemic effects of *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice. *Nutrition* 26, 321-330
4. Kahlon, T.S.; Chapman, M.H.; and Smith, G.E. 2006. In vitro binding of bile acids by okra, beets, asparagus, eggplant, turnips, green beans, carrots, and cauliflower. *Food Chemistry* 103, 676– 680
5. Barbana, Chockry; Boucher, Anne Claire, and Boye, Joyce Irene. 2011. In vitro binding of bile salts by lentil flours, lentil protein concentrates and lentil protein hydrolysates. *Food Research International* 44, 174– 180
6. Moukala, Jaucricque Ursulla Kongo-Dia; Zhang, Hui; and Irakoze, Pierre Claver. 2011. In Vitro Binding Capacity of Bile Acids by Defatted Corn Protein Hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 1066– 1080
7. Erdmann, Kati; Cheung, Belinda W.Y.; and Schroder Henning. 2008. The Possible Roles of Food-Derived Bioactive Peptides in Reducing the Risk of Cardiovascular Disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 643–654.
8. Shahidi, Fereidoon and Zhong, Ying. 2008. Bioactive Peptides. *Journal Of Aoac International Vol. 91, No. 4*, 914-931
9. Belovic, Miona M.; Mastilovic, Jasna S.; Torbica, Aleksandra M.; Tomic, Jelena M.; Stanic, Dusica R.; and Dzinic, Natalija R.. 2011. Potential of Bioactive Proteins and Peptides for Prevention and Treatment of Mass non-Communicable Diseases. *Food and Feed Research* 38 (2), 51-61
10. Panggayuh, Diah Puri P. dan Wikandari, Prima Retno. 2014. Pengaruh Konsentrasi Amonium Sulfat terhadap Aktivitas Protease Ekstraseluler *Lactobacillus plantarum* B1765 Isolat Bekasam. *UNESA Journal of Chemistry Vol. 3 No. 3*, 42– 48
11. Wikandari, Prima Retno; Suparmo; Marsono, Yustinus; dan Rahayu, Endang Sutriswati. 2011. Potensi Bekasam Bandeng (*Chanos chanos*) sebagai Sumber Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitor. *Biota Vol. 16 (1)*, 145–152
12. Hadiyanti, Meilina Rizky, dan Wikandari, Prima Retno. 2013. Pengaruh Konsentrasi dan Penambahan Bakteri Asam Laktat *Lactobacillus plantarum* B1765 sebagai Kultur Starter terhadap Mutu Produk Bekasam Bandeng (*Chanos chanos*). *UNESA Journal of Chemistry Vol. 2 No. 3*, 136– 143
13. Wikandari, Prima Retno; dan Yuanita, Lenny. 2014. Potensi Bekasam yang difermentasi dengan *Lactobacillus plantarum* B1765 dalam Menurunkan Tekanan Darah Tikus Hipertensi. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, ISBN : 978-602-0951-00-3
14. Yusmarini; Indriati, Retno; Utami, Tyas; dan Marsono, Yustinus. 2013. Pengikatan Garam Empedu Oleh Susu Kedelai Terfermentasi Dan Stabilitasnya Terhadap Pepsin Dan Pankreatin. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan Vol. 24 No. 1*, 105-109
15. Zhong, Fang, Zhang, Xiaomei, Ma, Jianguo, Shoemaker, Charles F. 2007. Fractionation and identification of a novel hypocholesterolemic peptide derived from soy protein Alcalase hydrolysates. *Food Res International Vol 40 No.6*, 756-762.