

**INHIBITOR 3-HIDROKSI-3-METILGLUTARIL KOENZIM A
REDUKTASE DARI *Lactobacillus acidophilus*
ASAL BEKASAM**

R I N T O



**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2015**

PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA*

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi berjudul Inhibitor 3-Hidroksi 3-Metilglutaril Koenzim A Reduktase dari *Lactobacillus acidophilus* Asal Bekasam adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, 11 November 2015

R i n t o
NRP F261110031

RINGKASAN

R I N T O. Inhibitor 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Reduktase dari *Lactobacillus acidophilus* Asal Bekasam. Dibimbing oleh MAGGY THENAWIDJAJA SUHARTONO, RATIH DEWANTI, dan SEDARNAWATI YASNI

Penyakit jantung merupakan penyebab kematian utama di dunia dan pada umumnya 90% dari kasus penyakit jantung diawali oleh timbulnya aterosklerosis yang merupakan akumulasi kolesterol dalam lapisan arteri sebagai akibat tingginya kadar kolesterol darah. Penurunan kadar kolesterol darah dapat dilakukan dengan membatasi biosintesis kolesterol dengan cara menghambat aktivitas enzim 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-KoA) reduktase, yaitu enzim yang berperan penting merubah substrat HMG-KoA menjadi mevalonat dalam tahapan awal biosintesis kolesterol. Penelitian ini bertujuan mengkaji potensi ekstrak bekasam sebagai penghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase dan mengisolasi bakteri dari bekasam yang menghasilkan inhibitor HMG-KoA reduktase dari bekasam serta karakterisasinya.

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahap. Tahap pertama adalah analisis kemampuan ekstrak bekasam dalam menghambat enzim HMG-KoA reduktase serta mengetahui keberadaan senyawa statin dalam bekasam. Tahap kedua yaitu isolasi dan skrining bakteri penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase. Tahap ketiga yaitu produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dan tahap keempat yaitu identifikasi lanjut komponen bioaktif penghambat HMG-KoA reduktase.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak bekasam dapat mereduksi aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Bekasam mengandung statin dengan kisaran 73 – 88 ppm. Bekasam dari ikan seluang memiliki rata-rata inhibisi HMG-KoA reduktase serta kandungan statin yang lebih tinggi dibandingkan dengan bekasam dari ikan gabus. Seleksi terhadap bakteri dari bekasam menghasilkan *Lactobacillus acidophilus* yang menghasilkan statin jenis lovastatin dan dapat menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Bakteri ini memproduksi lovastatin optimum pada suhu 25 °C dengan pH 7.0, ketika diinkubasi dalam media *de Man Rogosa Sharpe Broth* (MRS cair) dan menghasilkan lovastatin 62.90 ppm dengan daya inhibisi 76.19%. Fraksinasi lebih lanjut menghasilkan metabolit dengan daya inhibisi tinggi terhadap enzim HMG-KoA reduktase yaitu fraksi peptida dengan berat molekul 3 – 10 kD dan fraksi non peptida dengan berat molekul < 3 kD, yang menghambat enzim HMG-KoA reduktase berturut-turut 87.88% dan 93.94%. Fraksi peptida dengan berat molekul 6.3 kD mempunyai urutan/sekuen asam amino KGENYNTGVTPNLRPKAAEVVAFLNKEAIEAIADTMKK, sedangkan fraksi non peptida merupakan lovastatin yang diidentifikasi dengan HPLC. Penelitian ini menyimpulkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang diisolasi dari bekasam menghasilkan lovastatin dan peptida 6.3 kD yang berfungsi sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase.

Kata kunci: bekasam, *Lactobacillus acidophilus*, inhibitor HMG-KoA reduktase

SUMMARY

R I N T O. Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Produced by *Lactobacillus acidophilus* from *Bekasam*. Supervised by MAGGY THENAWIDJAJA SUHARTONO, RATIH DEWANTI, and SEDARNAWATI YASNI.

Heart disease is a primary cause of death in the world and 90% of heart disease is related to atherosclerosis i.e. an accumulation of cholesterol in the artery which is caused by high level of serum cholesterol. Decreasing of serum cholesterol level can be done by inhibition of cholesterol biosynthesis through inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase enzyme, an enzyme responsible for cholesterol biosynthesis pathway which produces mevalonate from HMG-CoA. The purposes of this research were to study the potential of *bekasam* extract to inhibit HMG-CoA reductase, isolate bacteria from *bekasam* which produce inhibitor of HMG-CoA reductase, and characterize of the inhibitors.

This study was done in the 4 steps. The first step was to analyse the potential of *bekasam* as HMG-CoA reductase inhibitor and statin content in the *bekasam* extract. The second step was to isolate and screen bacteria from *bekasam* that produce HMG-CoA reductase inhibitor, further third step was fermentation of the bacteria to produce HMG-CoA reductase inhibitor and the fourth step was to characterize and identify the bioactive compounds (statin and peptide) acting as inhibitor of HMG-CoA reductase.

The results showed that *bekasam* extract can reduce the activity of HMG-CoA reductase enzyme. The statin content of *bekasam* ranged between 73 – 88 ppm. *Bekasam* extract from *seluang* fish (*Rasbora sp*) showed higher inhibition of HMG-CoA reductase activity than those from snakehead fish (*Channa striata*). Screening for statin producing bacteria from *bekasam* extract revealed that *Lactobacillus acidophilus* was capable of producing statin compound, namely lovastatin which could inhibit HMG-CoA reductase. The bacterium produced lovastatin optimally at temperature 25 °C, pH 7.0 when incubated for 5 days in de Man Rogosa Sharpe (MRS) broth medium. The extra cellular fractions of *Lactobacillus acidophilus* inhibited HMG-CoA reductase by 76.19%. Upon further fractionation, the highest inhibition of HMG-CoA reductase was related to molecules of 3-10 kD (a peptide) and < 3 kD (nonpeptide/lovastatin) which inhibited the enzyme by 87.88% and 93.94% respectively. The peptide fraction with apparent molecule weigh of 6.3 kD had an amino acid sequence of KGENYNTGVTPNLRPKAAEVVAFLNKEAIEAIAIDTMKK. This study shows that *Lactobacillus acidophilus* isolated from *bekasam* produced lovastatin and peptide (6.3 kD) as HMG-CoA reductase inhibitors.

Keywords: *Bekasam*, *Lactobacillus acidophilus*, HMG-CoA reductase inhibitor

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2015

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB

**INHIBITOR 3-HIDROKSI-3-METILGLUTARIL KOENZIM A
REDUKTASE DARI *Lactobacillus acidophilus*
ASAL BEKASAM**

R I N T O

Disertasi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Doktor
pada Program Studi Ilmu Pangan

**SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2015**

Penguji Luar Komisi Ujian Tertutup:

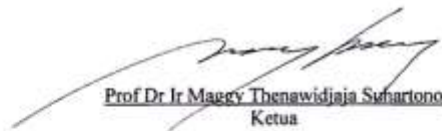
1. Dr Ir Dahrul Syah MSc Agr
(Dekan Sekolah Pasca Sarjana IPB)
2. Prof Dr Ir Lilis Nuraida MSc
(Staf Pengajar Program Ilmu Pangan, Sekolah Pasca Sarjana IPB)

Penguji Luar Komisi Ujian Promosi/Terbuka:

1. Dr Ir Dahrul Syah MSc Agr
(Dekan Sekolah Pasca Sarjana IPB)
2. Raymond R Tjandrawinata PhD MS MBA
(Executive Director, Dexa Laboratories of Biomolecular Science)

Judul Disertasi : Inhibitor 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Reduktase
dari *Lactobacillus acidophilus* Asal Bekasam
Nama : Rinto
NIM : F261110031

Disetujui oleh
Komisi Pembimbing


Prof. Dr. Ir. Maggy Thenawidjaja Suhartono
Ketua


Prof. Dr. Ir. Ratih Dewanti MSc
Anggota


Prof. Dr. Ir. Sedarnawati Yasni M Agr
Anggota

Diketahui

Ketua Program Studi Ilmu Pangan

Dekan Sekolah Pascasarjana IPB


Prof. Dr. Ir. Ratih Dewanti MSc



Tanggal Ujian Tertutup: 05 Oktober 2015

Tanggal Lulus : 02 DEC 2015

Tanggal Ujian Promosi : 11 November 2015

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Sholawat dan salam semoga tercurah pada Nabi Muhammad SAW. Penelitian Produksi dan Identifikasi Inhibitor 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Reduktase dari *Lactobacillus acidophilus* Asal Bekasam dilaksanakan sejak bulan April 2013 hingga Februari 2015.

Penelitian ini dapat terselesaikan karena bantuan berbagai pihak, oleh karena itu pada ruang ini penulis menyampaikan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada komisi pembimbing (Prof Dr Ir Maggy Thenawidjaja Suhartono, Prof Dr Ir Ratih Dewanti MSc, dan Prof Dr Sedarnawati Yasni MAgr) yang selalu memberikan ilmu, dukungan serta meluangkan waktu untuk membimbing penulis selama penelitian dan penyelesaian disertasi ini. Penguji luar komisi pada ujian tertutup dan ujian promosi (Dr Ir Dahrul Syah MSc Agr dan Prof Dr Ir Lilis Nuraida MSc serta Raymond R Tjandrawinata PhD MS MBA) atas saran-saran yang diberikan untuk memperdalam kajian dalam disertasi.

Rektor IPB, Dekan Pascasarjana IPB, Dekan Fateta, Ketua Program Studi Ilmu Pangan (IPN) dan Staf Pengajar IPN IPB serta Dirjend Dikti yang telah memberikan beasiswa BPPS selama studi S3. Rektor Universitas Sriwijaya, Dekan Fakultas Pertanian Unsri, dan Ketua Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Unsri atas izin studi S3 yang diberikan.

Kepala Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) IPB atas izin penggunaan laboratorium yang diberikan, para laboran yang berperan besar selama proses penelitian, terutama Ibu Ika, Pak Pras dan Mbak Ari. Rekan-rekan kerja di Lab. Mikrobiologi dan Biokimia PPSHB IPB: Mbak Diana (Undip), Novan, Ino, Diana, Sylvi, dan Mbak Eni. Rekan-rekan IPN 2011: Pak Tahrir, Pak Wahid, Pak Subaryono, Pak Sabariman, Pak Dwi, Pak Faleh, Bu Asnani, Bu Retnani, Bu Fitri, Bu Eni, Bu Heni, Bu Sherly serta kakak tingkat dan adik tingkat IPN (S2 dan S3) yang tidak bisa disebutkan satu persatu, terimakasih atas persaudaraannya.

Keluarga besarku, Bapak Waris dan Ibu Roliyah, Kakakku : Warsini, Heniwariyati, dan Rohayanto atas dukungan serta doa-doa yang senantiasa dipanjatkan. Keluarga besar Karangsono Sragen, Bapak H. Djuwaeni dan ibu, serta adik-adik (Tri Rahmawati, Dwi, Agung dan Ira) yang selalu mendukung dalam penyelesaian studi S3.

Istriku tercinta (Dr Yunindyawati SSos MSi) atas dukungan dan kesabaran yang luar biasa dalam mendampingi dan menjalani kehidupan. Anak-anakku tersayang (Muhammad Barid Fathan Hanan, Muhammad Hafid Hanafi (Alm) dan Muhammad Luthfi Hanafi) yang selalu menjadi permata hati dan *qurrota a'yun* bagi kami. Karya ini saya persembahkan untuk guru-guruku yang telah memberikan tetesan ilmu serta orang-orang yang mencintaiku.

Bogor, 11 November 2015

R i n t o

DAFTAR ISI

| | | |
|---|--|----|
| 1 | PENDAHULUAN | |
| | Latar Belakang | 1 |
| | Tujuan Penelitian | 2 |
| | Manfaat Penelitian | 2 |
| | Ruang Lingkup Penelitian | 2 |
| | Novelty | 3 |
| 2 | TINJAUAN PUSTAKA | |
| | Bekasam | 5 |
| | Produk Fermentasi sebagai Pangan Fungsional | 6 |
| | Kolesterol | 7 |
| | Biosintesis Kolesterol | 9 |
| | Inhibitor HMG-KoA Reduktase | 12 |
| | Statin sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase | 12 |
| | Peptida sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase | 15 |
| 3 | METODE PENELITIAN | |
| | Waktu dan Tempat Penelitian | 19 |
| | Bahan dan Alat Penelitian | 19 |
| | Tahapan Penelitian | 19 |
| | Penelitian Tahap Pertama | 20 |
| | Analisis inhibisi ekstrak bekasam terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase | 21 |
| | Analisis kandungan statin pada ekstrak bekasam | 21 |
| | Penelitian Tahap Kedua | 22 |
| | Isolasi dan skrining bakteri penghasil statin | 22 |
| | Analisis kandungan statin pada metabolit bakteri | 22 |
| | Analisis penghambatan ekstrak metabolit bakteri terhadap enzim HMG-KoA reduktase | 23 |
| | Identifikasi bakteri penghasil statin | 23 |
| | Penelitian Tahap Ketiga | 25 |
| | Produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dari <i>Lactobacillus acidophilus</i> dengan variasi suhu dan pH inkubasi pada media MRS cair | 25 |
| | Analisis kandungan lovastatin | 25 |
| | Daya inhibisi komponen bioaktif dari <i>L. acidophilus</i> | 26 |
| | Penelitian Tahap Keempat | 26 |
| | Fraksinasi komponen bioaktif <i>L. acidophilus</i> dan daya inhibisi terhadap enzim HMG-KoA reduktase | 26 |
| | Analisis peptida dengan SDS PAGE | 27 |
| | Sekuensing dan pemodelan peptida inhibitor HMG-KoA reduktase | 28 |
| 4 | HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| | Bekasam sebagai Sumber Inhibitor HMG-KoA Reduktase | 29 |
| | Daya Inhibisi Ekstrak Bekasam terhadap Aktivitas HMG-KoA Reduktase | 29 |
| | Kandungan Statin dalam Ekstrak Bekasam | 30 |

| | |
|--|----|
| Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Inhibitor Enzim HMG-KoA Reduktase Asal Bekasam | 31 |
| Bakteri Resisten terhadap Statin | 31 |
| Analisis Produksi Statin | 33 |
| Penghambatan Metabolit Bakteri terhadap Enzim HMG-KoA Reduktase | 35 |
| Morfologi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lovastatin | 35 |
| Produksi Inhibitor HMG-KoA Reduktase oleh <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 36 |
| Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Produksi Lovastatin dan Inhibisi HMG-KoA Reduktase dari <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 36 |
| Pengaruh pH Media terhadap Produksi Lovastatin dan Inhibisi HMG-KoA Reduktase dari <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 38 |
| Kandungan Lovastatin Hasil Optimasi Kultur <i>L. acidophilus</i> | 40 |
| Identifikasi Lanjut Komponen Bioaktif Inhibitor Enzim HMG-KoA Reduktase Dari <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 41 |
| Fraksinasi dan Inhibisi Fraksi Metabolit <i>L. acidophilus</i> terhadap Enzim HMG-KoA Reduktase | 41 |
| Profil Peptida Fraksi Metabolit <i>L. acidophilus</i> | 41 |
| Profil Peptida Ekstrak Bekasam | 42 |
| Peptida Inhibitor HMG-KoA Reduktase | 43 |
| | |
| 5 SIMPULAN DAN SARAN | |
| Simpulan | 49 |
| Saran | 49 |
| | |
| DAFTAR PUSTAKA | |

DAFTAR TABEL

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Batasan kandungan kolesterol darah | 9 |
| 2 | Statin dan sumber produksinya | 14 |
| 3 | Volume pereaksi uji inhibitor HMG-KoA reduktase | 21 |
| 4 | <i>Optical density</i> (OD) kultur bakteri dari bekasam | 31 |
| 5 | Morfologi bakteri yang resisten terhadap compactin dan lovastatin | 32 |
| 6 | Hasil analisis statin menggunakan HPLC dari 5 isolat bakteri yang potensial memproduksi statin | 34 |
| 7 | Perbandingan susunan asam amino peptida 6.3 kD dengan peptida dari <i>Lactobacillus</i> lainnya | 43 |
| 8 | Perbandingan susunan asam amino peptida penurun kolesterol | 45 |

DAFTAR GAMBAR

| | | |
|----|--|----|
| 1 | Produk fermentasi ikan | 5 |
| 2 | Struktur kimia kolesterol | 8 |
| 3 | Empat tahap biosintesis kolesterol dalam hati | 10 |
| 4 | Perombakan HMG-KoA menjadi mevalonat oleh enzim HMG-KoA reduktase | 11 |
| 5 | Struktur dasar dan perbedaan berbagai statin | 13 |
| 6 | Persamaan struktur lovastatin dan HMG-KoA | 15 |
| 7 | Struktur peptida | 16 |
| 8 | Tahapan penelitian | 20 |
| 9 | Diagram alir penelitian tahap I | 20 |
| 10 | Diagram alir penelitian tahap II | 24 |
| 11 | Diagram alir penelitian tahap III | 25 |
| 12 | Diagram alir penelitian tahap IV | 27 |
| 13 | Bekasam ikan gabus dan bekasam ikan seluang | 29 |
| 14 | Inhibisi ekstrak bekasam terhadap enzim HMG-KoA reduktase | 29 |
| 15 | Kandungan statin pada ekstrak bekasam | 30 |
| 16 | Kandungan statin dari isolat bakteri asal bekasam | 33 |
| 17 | Daya inhibisi isolat bakteri dari bekasam terhadap enzim HMG-KoA reduktase | 35 |
| 18 | Pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan <i>L. acidophilus</i> , produksi lovastatin dan inhibisi HMG-KoA reduktase | 37 |
| 19 | Pengaruh pH media inkubasi terhadap pertumbuhan <i>L. acidophilus</i> , produksi lovastatin dan inhibisi HMG-KoA reduktase | 39 |
| 20 | Daya inhibisi fraksi metabolit <i>L. acidophilus</i> terhadap enzim HMG-KoA reduktase | 41 |
| 21 | Profil peptida dari fraksi metabolit <i>L. acidophilus</i> | 42 |
| 22 | Profil peptida ekstrak bekasam | 42 |
| 23 | Struktur 3 dimensi pengikatan enzim HMG-KoA reduktase dengan subtrat HMG-KoA dan Lovastatin | 46 |
| 24 | Model struktur peptida 6.3 kD dan lovastatin menggunakan SWISS-MODEL dan RasMol | 47 |

1 PENDAHULUAN

Latar Belakang

Penyakit jantung merupakan penyebab kematian utama di negara maju maupun negara berkembang dan telah dilaporkan sebanyak 12.8% dari total kematian di dunia disebabkan oleh serangan jantung (WHO 2011). Di Indonesia, studi pada 440 daerah di 33 provinsi pada tahun 2007 menunjukkan bahwa penderita penyakit jantung mencapai 9.3% dari total populasi dan jumlahnya terus meningkat sebanyak 10% setiap tahunnya (Delima *et al.* 2009). Berdasarkan data diagnosis tenaga kesehatan tahun 2013, penderita penyakit jantung dan stroke di Indonesia mencapai 12.1% dari jumlah penduduk (www.depkes.go.id).

Pada umumnya 90% kasus penyakit jantung diawali oleh timbulnya aterosklerosis yang merupakan akumulasi kolesterol dalam lapisan arteri sebagai akibat tingginya kadar kolesterol darah atau hiperkolesterolemia. Hiperkolesterolemia dipengaruhi oleh konsumsi makanan yang mengandung gula tinggi, lemak teroksidasi, kolesterol tinggi serta sintesis kolesterol dalam hati. Pola makan manusia saat ini yang banyak mengkonsumsi makanan berkolesterol tinggi dapat menyebabkan peningkatan kolesterol darah, sehingga jumlah kasus hiperkolesterolemia dan penyakit jantung terus meningkat.

Penurunan kadar kolesterol darah dapat dilakukan dengan mengatur pola makan, membatasi biosintesis kolesterol, dan meningkatkan perombakan kolesterol menjadi asam empedu. Pembatasan biosintesis kolesterol dan lemak dapat dilakukan dengan menghambat aktivitas enzim 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktase/HMG-KoA reduktase (Lachenmeier *et al.* 2012), serta menghambat enzim piruvat dehidrogenase (Cheng & Lai 2000), selain itu peningkatan aktivitas enzim kolesterol 7 α -hidroksilase/CYP7A1 yang merombak kolesterol menjadi asam empedu juga dapat menurunkan kolesterol darah (Kato *et al.* 2009)

Statin merupakan komponen bioaktif yang berperan sebagai inhibitor bagi enzim HMG-KoA reduktase sehingga mampu membatasi sintesis kolesterol dalam hati. Statin mereduksi aktivitas HMG-KoA reduktase sampai dengan 95% (Lachenmeier *et al.* 2012). Statin disintesis melalui jalur poliketida sebagai metabolisme sekunder oleh beberapa bakteri dan kapang, diantaranya yaitu *Penicillium citrinum*, *Aspergillus terreus*, *Bacillus megaterium*, dan *Salmonella enterica* (Barrios-Gonzales & Miranda 2010).

Di samping statin, peptida merupakan senyawa lain yang juga mampu menurunkan aktivitas enzim HMG-KoA reduktase (Kato *et al.* 2009). Beberapa peptida yang mampu menurunkan kolesterol dan aktivitas enzim HMG-KoA reduktase adalah peptida hasil ekstraksi herbal *Senna obtusifolia* (Chuhua *et al.* 2008), peptida dari kentang dan kedelai (Liyanage *et al.* 2008) serta peptida sintetis yaitu peptida Ile-Ile-Ala-Glu-Lys (Kirana *et al.* 2005) dan peptida Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg (Gupta *et al.* 2005).

Produk pangan fermentasi telah dilaporkan mampu menurunkan kolesterol, diantaranya susu terfermentasi berfungsi sebagai antihiperkolesterolemia karena mengandung peptida turunan dari β laktoglobulin (Ebringer *et al.* 2008). *Kimchi* juga diketahui mampu mereduksi kolesterol total dalam darah (Park *et al.* 2012). Beras merah terfermentasi mampu menurunkan kolesterol dengan menghambat

aktivitas enzim HMG-KoA reduktase sampai dengan 80% (Lachenmeier *et al.* 2012). Ekstrak *narezushi* dan *heshiko* (produk fermentasi ikan di Jepang) mampu mereduksi aktivitas HMG-KoA reduktase sebesar 59-65% sehingga mampu menurunkan konsentrasi kolesterol dalam darah. Penurunan kolesterol tersebut disebabkan oleh adanya komponen bioaktif yang dihasilkan mikroorganisme selama proses fermentasi berupa fraksi peptida dan non peptida (Itou & Akahene 2009 dan 2010).

Narezushi dan *heshiko* merupakan produk fermentasi ikan yang dibuat seperti halnya bekasam di Indonesia, *burong-isda* dan *burong-bangus* di Filipina, *pla-ra* dan *pla-com* di Thailand (Itou & Akahane 2009 dan 2010; Rhee *et al.* 2011; Wikandari *et al.* 2012). Bekasam merupakan produk fermentasi ikan tradisional Indonesia yang banyak ditemukan di Sumatera Selatan. Selama ini bekasam dikenal memiliki sifat fungsional sebagai antihipertensi. Kajian bekasam sebagai penurun kolesterol belum dilakukan. Oleh karena itu dalam penelitian ini dikaji komponen bioaktif pada bekasam yang mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase serta mengisolasi dan memilah bakteri yang memproduksinya. Fraksinasi berdasarkan berat molekul dilakukan untuk menentukan komponen bioaktif yang paling optimum menghambat enzim HMG-KoA reduktase, termasuk kedalam golongan statin (berat molekul < 500 D) ataukah peptida (BM > 1000 D). Hasil penelitian ini diharapkan menjadi dasar bagi pengembangan pangan fungsional dari produk fermentasi yang mengandung senyawa penghambat sintesis kolesterol.

Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan mempunyai tujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui kemampuan inhibisi ekstrak bekasam terhadap enzim HMG-KoA reduktase.
2. Memperoleh bakteri dari bekasam sebagai penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase.
3. Memperoleh kondisi optimum bagi pertumbuhan mikroorganisme dan biosintesis inhibitor HMG-KoA reduktase.
4. Memperoleh informasi karakteristik (berdasarkan berat molekul) komponen bioaktif inhibitor HMG-KoA reduktase dari bakteri asal bekasam.

Manfaat Penelitian

Penemuan komponen bioaktif inhibitor HMG-KoA reduktase dari mikroorganisme asal bekasam dapat dijadikan sebagai langkah awal untuk mengoptimalkan bekasam sebagai pangan fungsional.

Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian yang dilakukan meliputi kajian kemampuan ekstrak bekasam dalam menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase, profil komponen bioaktif penghambat enzim HMG-KoA reduktase dari ekstrak bekasam, skrining dan identifikasi bakteri yang menghasilkan inhibitor HMG-KoA reduktase, optimasi produksi inhibitor HMG-KoA reduktase serta identifikasi komponen bioaktif penghambat enzim HMG-KoA reduktase.

Novelty

Kebaruan dari penelitian ini adalah:

1. *Lactobacillus acidophilus* belum pernah dilaporkan sebagai penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* yang diisolasi dari bekasam terbukti mampu menghasilkan inhibitor HMG-KoA reduktase berupa lovastatin maupun peptida 6.3 kD.
2. Kajian bekasam sebagai pangan fungsional hanya sebatas sebagai inhibitor ACE yang berpotensi menurunkan hipertensi sedangkan hasil penelitian ini menunjukkan bahwa bekasam mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase sehingga berpotensi sebagai makanan penurun kolesterol, dengan demikian menambah manfaat bekasam sebagai pangan fungsional.

2 TINJAUAN PUSTAKA

Bekasam

Bekasam merupakan produk olahan ikan hasil fermentasi yang rasanya asam. Olahan tersebut banyak dikenal di daerah Sumatera Selatan dan Kalimantan Selatan. Ikan yang dapat digunakan sebagai bekasam merupakan jenis ikan air tawar seperti ikan Lele, Mas, Tawes, Gabus, Nila dan Mujair. Umumnya pengolahan bekasam menggunakan penambahan garam sekitar 15-20%, dan beras/nasi sebanyak 15%, kemudian dilakukan proses fermentasi selama satu minggu sampai menghasilkan aroma dan rasa bekasam yang khas.

Di Asia Tenggara terdapat beberapa produk fermentasi ikan yang serupa dengan bekasam yaitu *heshiko* dan *narezushi* (Jepang), *burongisda* (Filipina), dan *pla-ra* (Thailand). Kesamaan produk fermentasi tersebut terdapat pada bahan baku utamanya yaitu ikan, garam dan nasi/beras yang dibuat dengan cara fermentasi spontan. *Narezushi* merupakan produk fermentasi ikan yang berbahan dasar ikan *mackerel* maupun ikan air tawar dengan fermentasi menggunakan garam 5% dan penambahan *boiled rice* (nasi). *Heshiko* juga menggunakan ikan *mackerel* sebagai bahan baku namun garam yang ditambahkan lebih tinggi (> 20%) dan adanya penambahan *rice bran*/beras (Itou & Akahane 2009; 2010). Produk bekasam, *narezushi* dan *heshiko* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1 Produk fermentasi ikan; *narezushi* (A), *heshiko* (B) dan bekasam (C)

(www.kyotofoodie.com)

Beberapa mikroorganisme diketahui terlibat selama proses fermentasi ikan. Bakteri asam laktat merupakan mikroorganisme yang tumbuh dan berkembang lebih dominan dibandingkan dengan khamir. *Lactobacillus plantarum* dan *Leuconostoc mesenteroides* merupakan kelompok bakteri yang dominan pada *narezushi*, *Pediococcus* pada *pla-ra*. *Lactobacillus brevis* dominan pada *burongisda* (Rhee *et al.* 2011) dan pada bekasam didominasi oleh *Lactobacillus*, *Pediococcus*, dan *Leuconostoc* (Wikandari *et al.* 2012).

Ketiga kelompok bakteri pada bekasam memiliki karakteristik yang berbeda-beda yaitu: *Lactobacillus* merupakan bakteri berbentuk batang, Gram positif dan katalase negatif. Golongan *Lactobacillus* dari bekasam ada yang menghasilkan gas selama fermentasi (*heterofermentatif*) dan ada yang tidak menghasilkan gas (*homofermentatif*), bersifat mesofilik, tumbuh pada kadar garam 6.5% dan pH 4.2-9.6. *Pediococcus* berbentuk bulat dan tersusun secara *tertrat*, tidak menghasilkan gas (*homofermentatif*), bersifat mesofilik, tumbuh pada kadar garam 6.5% dan pH 4.2-9.6. *Leuconostoc* berbentuk bulat namun tidak *tetrat*,

menghasilkan gas (*heterofermentatif*), bersifat mesofilik, tumbuh pada kadar garam 6.5% dan pH 4.2- 9.6 (Wikandari *et al.* 2012).

Desniar *et al.* (2012) memperoleh *Pediococcus pentosaceus* dan *Lactobacillus plantarum* dari bekasam. *Pediococcus pentosaceus* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk bulat, tidak berspora, katalase negatif, tidak menghasilkan gas, tumbuh optimum pada 30 – 37 °C, NaCl (2-7%) dan pH (4.4 – 8.0). *Lactobacillus plantarum* merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang, tidak berspora, tidak menghasilkan gas, katalase negatif, non motil, tumbuh optimum pada suhu 30-37 °C, NaCl (2-7%), dan pH (4.4 – 8.0). Selama proses fermentasi bekasam, tidak ada golongan bakteri tertentu yang mendominasi pada hari ke-1 sampai ke-3, namun setelah hari ke-4 sampai 10, bakteri berbentuk batang (basil) merupakan golongan bakteri yang mendominasi selama proses fermentasi bekasam.

Bekasam sebagai makanan tradisional tidak hanya digunakan sebagai sumber nutrisi tetapi juga diketahui mempunyai khasiat bagi kesehatan manusia. Wikandari (2011) menyatakan bahwa bekasam bermanfaat dalam menurunkan hipertensi dengan menghambat aktivitas enzim *Angiotensin I Converting Enzyme* (ACE). Manfaat bekasam terhadap kesehatan lainnya belum diketahui, oleh karena itu perlu dikembangkan kajian fungsi bekasam terhadap penurunan penyakit degeneratif lainnya seperti hiperlipidemia, mengingat beberapa produk fermentasi juga diketahui berfungsi sebagai penurun kolesterol.

Produk Fermentasi sebagai Pangan Fungsional

Makanan dan minuman hasil fermentasi merupakan bagian dari diet manusia. Berbagai produk fermentasi yang dihasilkan/dikonsumsi oleh kelompok etnis tertentu diketahui mempunyai fungsi positif dalam menjaga kesehatan manusia, sehingga makanan fermentasi dikenal mempunyai sifat sebagai makanan fungsional (*functional food*), diantaranya sebagai antioksidan, antiobesitas, antihipertensi, antikolesterol, antidepresi/*stress*, anti kanker dan menghambat konstipasi.

Kimchi merupakan sayuran terfermentasi tradisional Korea yang memiliki manfaat sebagai makanan fungsional. *Kimchi* diketahui mengandung vitamin C, vitamin K, serat, klorofil dan senyawa fenolik. *Kimchi* yang difermentasi oleh *Weisella koreansis* OK1-6 dapat menghambat obesitas dengan cara mereduksi insulin dan leptin. Selain itu *kimchi* juga mampu mereduksi kolesterol total dalam darah (Park *et al.* 2012).

Produk susu kedelai terfermentasi (*soypro*) diketahui mampu menurunkan kolesterol total dan *Low density lipoprotein* (LDL), meningkatkan *High density lipoprotein* (HDL) serta menurunkan kadar glukosa darah. Penurunan kolesterol LDL disebabkan oleh adanya isoflavon dan produksi metabolit sekunder oleh bakteri asam laktat selama proses fermentasi (Kim *et al.* 2008).

Susu terfermentasi mempunyai berbagai manfaat fungsional bagi tubuh. Protein dan peptida dari susu yang memiliki kemampuan sebagai antimikrobia yaitu laktoferin, immunomodulator yaitu immunopeptida, inhibitor *Angitensin Converting enzyme* (ACE) yaitu laktokinin, antioksidan yaitu peptida turunan dari α -lactoalbumin dan β -lactoglobulin, serta hipekolesterolemia yaitu peptida turunan

dari β -Lactoglobulin dengan susunan asam amino Ile-Ile-Ala-Glu-Lys (Ebringer *et al.* 2008).

Hasil studi klinis mengindikasikan bahwa beberapa probiotik dapat mereduksi konsentrasi kolesterol pada darah, khususnya LDL. Beberapa teori mengasumsikan bahwa bakteri probiotik dapat melakukan metabolisme kolesterol dan mereduksi penyerapannya pada saluran pencernaan. Uji secara *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* yang menempel pada membran pencernaan dapat mengikat kolesterol. Selain itu juga menyebabkan dekonjugasi garam empedu sehingga mengurangi penyerapannya (Ebringer *et al.* 2008). Selain probiotik, *yogurt* yang dibuat dengan bakteri nonprobiotik juga dapat menurunkan kolesterol (Ataie-Jafari *et al.* 2009).

Selain sayuran dan susu terfermentasi, beras yang difermentasi oleh kapang yang sering disebut dengan angkak merah juga diketahui mempunyai sifat fungsional. Uji *in vitro* menunjukkan bahwa angkak merah mampu mereduksi aktivitas HMG-KoA reduktase sampai dengan 80% (Lachenmeier *et al.* 2012). Angkak merah diketahui mengandung senyawa bioaktif penghambat enzim HMG-KoA reduktase yaitu statin (Danuri 2008).

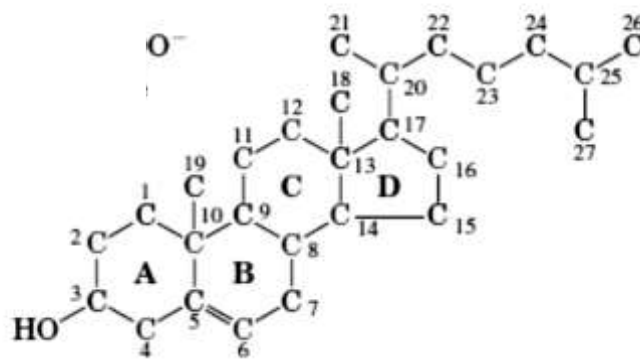
Beberapa produk fermentasi ikan juga terbukti mampu menurunkan kolesterol darah. Ekstrak *heshiko* dan *narezushi* sebanyak 50 mg yang digunakan sebagai ransum tikus selama 30 hari dapat menurunkan kadar total kolesterol plasma lipid, meningkatkan HDL-kolesterol, menurunkan LDL-kolesterol dan menurunkan trigliserida. Selain itu ekstrak *heshiko* dan *narezushi* juga dapat menghambat enzim HMG-KoA reduktase secara *in vitro* (Itou & Akahenane 2009 dan 2010). Bekasam sebagai produk fermentasi ikan Indonesia yang mirip dengan *heshiko* dan *narezushi* belum diketahui kemampuannya dalam penurunan kolesterol maupun penghambatan aktivitas HMG-KoA reduktase, oleh karena itu kajian lebih lanjut keberadaan inhibitor HMG-KoA reduktase pada bekasam sebagai produk fermentasi ikan yang mirip dengan *narezushi/heshiko* perlu dilakukan.

Kolesterol

Kolesterol merupakan komponen lemak yang diperlukan oleh tubuh untuk membentuk dinding sel. Selain itu, kolesterol berfungsi sebagai bahan pembentukan garam empedu dan hormon-hormon steroid. Kolesterol merupakan steroid yang terdiri dari 27 atom C dan membentuk 4 cincin karbon (Gambar 2). Kolesterol bersifat tidak larut dalam air. Keberadaannya dalam tubuh harus diedarkan dari jaringan pembentuknya ke jaringan lain, oleh sebab itu pengangkutan kolesterol dalam sirkulasi darah memerlukan perubahan susunan molekul menjadi bentuk kompleks lipid protein atau lipoprotein yang bersifat larut dalam air.

Beberapa jenis lipoprotein yang mengangkut lipid yaitu kilomikron, *Very low density lipoprotein* (VLDL), *Low density lipoprotein* (LDL), dan *High density lipoprotein* (HDL). Kilomikron merupakan lipoprotein yang terdiri dari 85% trigliserida, 3% kolesterol ester dan 1% kolesterol bebas, berfungsi sebagai pembawa trigliserida dari makanan ke jaringan lemak dan otot rangka serta membawa kolesterol makanan ke hati. VLDL yaitu lipoprotein yang terdiri dari 50% trigliserida, 12% kolesterol ester dan 7% kolesterol bebas, yang dibentuk dari asam lemak bebas di dalam hati dan dapat disintesis dari karbohidrat. Oleh karena

itu konsumsi karbohidrat yang tinggi dapat meningkatkan jumlah VLDL. LDL yaitu lipoprotein pengangkut kolesterol terbesar pada manusia (70%), mengandung 10% trigliserida, 37% kolesterol ester dan 8% kolesterol bebas. LDL berfungsi membawa kolesterol ke jaringan perifer untuk sintesis membran plasma dan hormon steroid. Kadar LDL plasma tergantung dari banyak faktor termasuk asupan kolesterol dalam makanan, asupan lemak jenuh, serta kecepatan produksi dan eliminasi LDL dan VLDL. HDL merupakan lipoprotein yang terdiri dari 15% kolesterol ester, 2% kolesterol bebas, 4% trigliserida dan 50% protein. Umumnya HDL membawa 20-25% kolesterol darah dan berfungsi mengangkut kolesterol dari jaringan perifer ke hati, sehingga penimbunan kolesterol di perifer berkurang (Nelson & Cox 2010).



Gambar 2 Struktur kimia kolesterol (Nelson & Cox 2010)

Metabolisme kolesterol dalam tubuh termasuk di dalam jalur metabolisme lipid/lemak. Metabolisme lipid dan lipoprotein dibagi ke dalam dua jalur yaitu eksogen dan endogen. Pada jalur eksogen, trigliserida dan kolesterol yang berasal dari makanan dalam usus dikemas dalam bentuk partikel besar lipoprotein yang disebut kilomikron dan dibawa ke dalam aliran darah. Trigliserida dalam kilomikron dirombak oleh enzim lipoprotein lipase membentuk asam lemak bebas dan kilomikron remnant. Kilomikron remnant merupakan kilomikron sisa yang kehilangan trigliserida. Asam lemak bebas menembus jaringan lemak atau sel otot untuk diubah menjadi trigliserida kembali sebagai cadangan energi, sedangkan kilomikron remnant dimetabolisme dalam hati dan menghasilkan kolesterol bebas. Sebagian kolesterol yang mencapai organ hati diubah menjadi asam empedu, yang kemudian dikeluarkan ke dalam usus. Asam empedu berfungsi seperti detergen dan membantu proses penyerapan lemak dari makanan. Sebagian lagi dari kolesterol dikeluarkan melalui saluran empedu tanpa dimetabolisme menjadi asam empedu, kemudian organ hati mendistribusikan kolesterol ke jaringan tubuh lainnya melalui jalur endogen. Pada akhirnya, kilomikron yang tersisa dibuang dari aliran darah oleh hati (Nelson & Cox 2010).

Pada jalur endogen, pembentukan trigliserida dalam hati meningkat apabila makanan sehari-hari mengandung karbohidrat yang berlebihan. Hati mengubah karbohidrat menjadi asam lemak, kemudian membentuk trigliserida, dan dibawa melalui aliran darah dalam bentuk VLDL dan dimetabolisme lanjut oleh enzim lipoprotein lipase menjadi IDL (*intermediate density lipoprotein*). IDL melalui

serangkaian proses diubah menjadi LDL yang kaya kolesterol. Lebih dari 75% dari kolesterol total dalam plasma normal manusia mengandung partikel LDL yang bertugas menghantarkan kolesterol ke dalam tubuh. Kolesterol yang tidak diperlukan dilepaskan ke dalam darah dan berikatan dengan HDL. HDL bertugas mengangkut kelebihan kolesterol dari dalam tubuh ke hati.

Kadar kolesterol dalam tubuh dapat meningkat jumlahnya karena asupan makanan yang berasal dari lemak hewani baik daging maupun telur. Kelebihan kolesterol dalam tubuh dikenal dengan hiperkolesterolemia, kondisi ini disebabkan oleh kadar kolesterol, triglesrida, LDL, VLDL, serta kilomikron dalam plasma darah melebihi bilangan-bilangan normal. *US Departement of Health and Human* (2012) menetapkan batasan kandungan kolesterol dalam darah (Tabel 1). Keadaan hiperkolesterolemia merupakan salah satu faktor resiko bagi penyakit jantung dan pembuluh darah khususnya aterosklerosis, yaitu terbentuknya plag pada arteri dan merupakan permulaan timbulnya beberapa penyakit yang berhubungan dengan jantung, seperti hipertensi, stroke dan serangan jantung (Victor *et al.* 2009).

Tabel 1 Batasan kandungan kolesterol darah

| Kriteria | Kolesterol Total (mg/dL) | LDL (mg/dL) | HDL (mg/dL) |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| Batas minimal | - | - | 40 |
| Optimal | < 200 | < 100 | >60 |
| Mendekati optimal | - | 100 – 129 | - |
| Batas maksimal | 200 – 239 | 130 – 159 | - |
| Tinggi | 240 | 160-189 | - |
| Sangat tinggi | - | 190 | - |

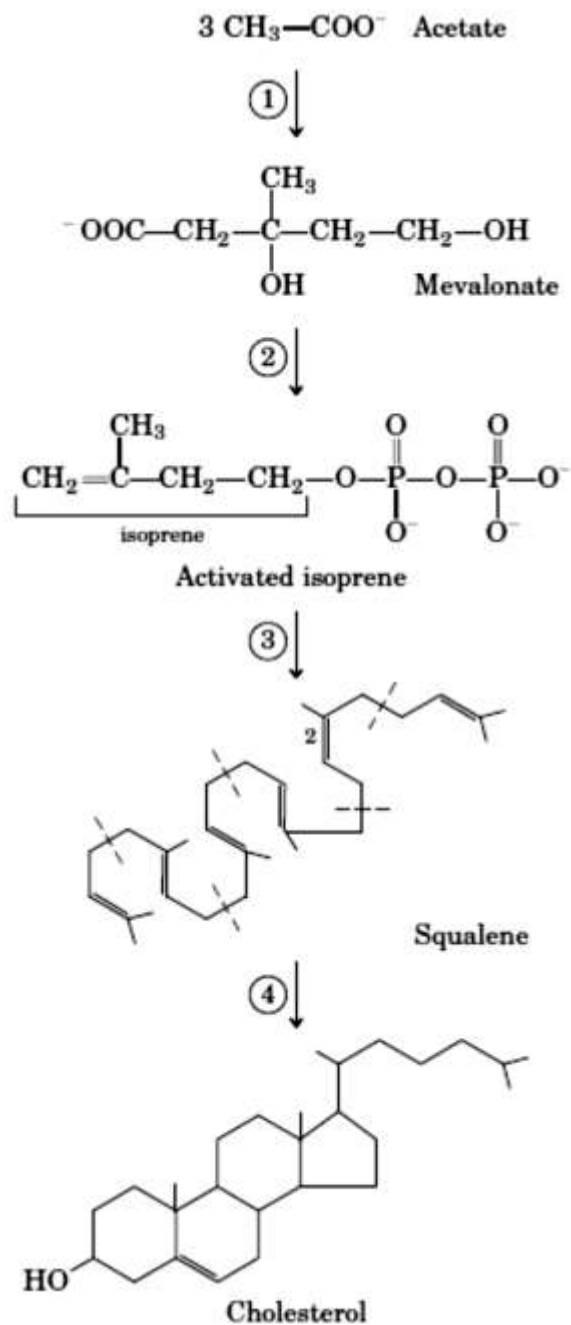
Sumber: *U.S Departement of Health and Human* (2012)

Biosintesis Kolesterol

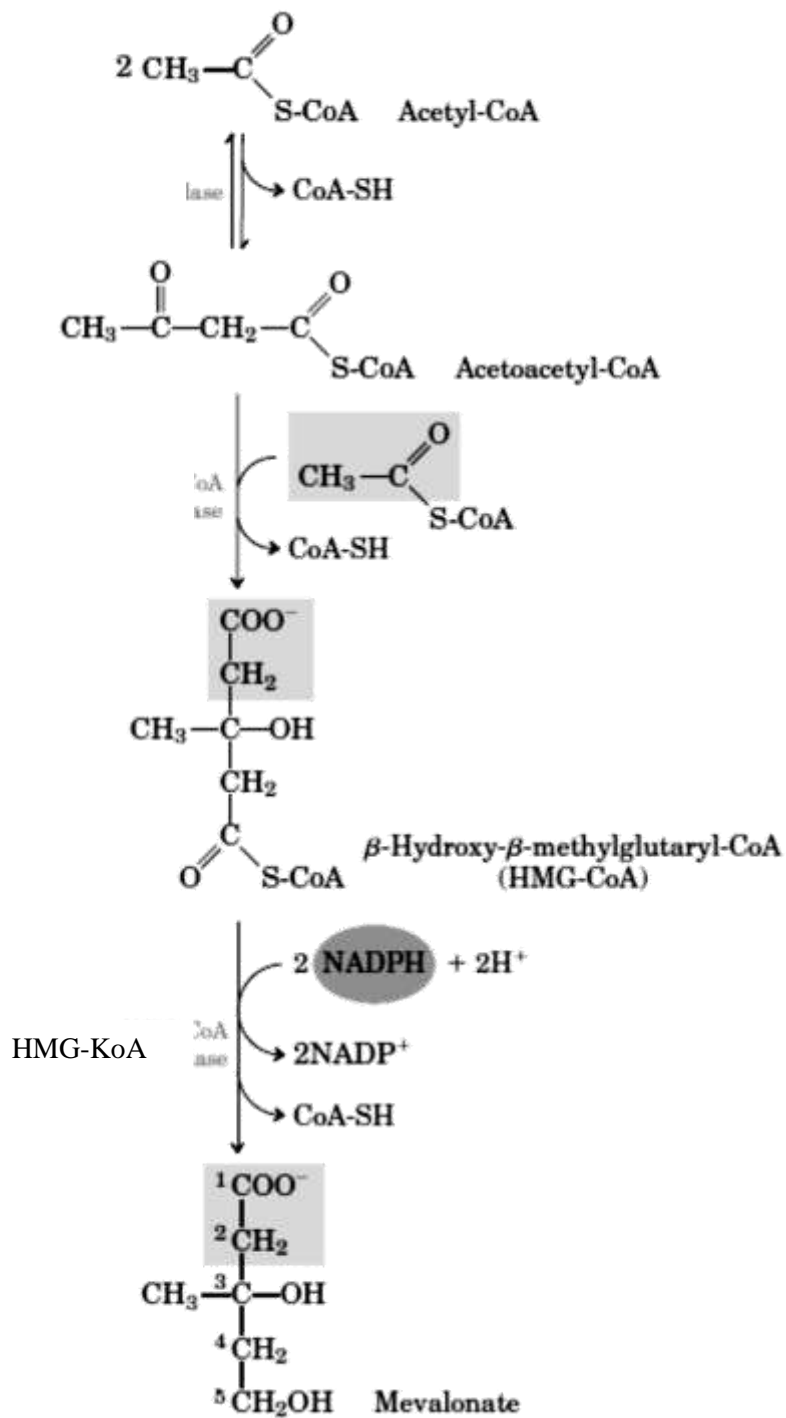
Asam lemak dan kolesterol dapat disintesis dari asetil KoA pada sebagian besar organ dan jaringan tubuh. Asetil KoA merupakan produk intermediet dari karbohidrat, lemak dan beberapa asam amino dari protein, sehingga hewan maupun manusia dapat mengubah substrat dari makanan menjadi kolesterol. Hati merupakan organ paling penting untuk sintesis kolesterol dalam tubuh. Sintesis kolesterol terjadi dalam 4 tahap yaitu pertama perubahan 3 asetat menjadi molekul intermediet yaitu mevalonat, kedua konversi mevalonat menjadi unit isopren, ketiga polimerisasi 9 dari 5 karbon unit isopren membentuk molekul 30 karbon yaitu skualen, dan keempat siklikasi skualen membentuk 4 ring steroid dan membentuk kolesterol (Nelson & Cox 2010). Secara ringkas biosintesis kolesterol dapat dilihat pada Gambar 3.

Proses perubahan asetat menjadi mevalonat dikatalis oleh enzim HMG-KoA reduktase sehingga HMG-KoA reduktase merupakan enzim yang berperan penting dalam tahap awal biosintesis kolesterol. Penghambatan terhadap aktivitas enzim

HMG-KoA reduktase dapat menghambat biosintesis kolesterol dalam hati. Proses perubahan dari HMG-KoA ke mevalonat dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3 Empat tahap biosintesis kolesterol dalam hati (Nelson & Cox 2010). Perubahan asetat menjadi mevalonat (1); perubahan mevalonat menjadi unit isopren (2); Perubahan isopren menjadi skualen (3); dan perubahan skualen menjadi kolesterol (4)



Gambar 4 Perombakan HMG-KoA menjadi mevalonat oleh enzim HMG-KoA reduktase (Nelson & Cox 2010)

Inhibitor HMG-KoA Reduktase

Sintesis kolesterol di dalam hati dipengaruhi oleh aktivitas enzim 3-Hidroksi-3-Metilglutaril Koenzim A Reduktase (HMG-KoA reduktase). HMG-KoA reduktase merupakan enzim yang unik pada awal biosintesis kolesterol, karena katalitiknya yang bersifat *irreversible* (Burg & Espenshade 2011). Enzim HMG-KoA reduktase ditemukan pada berbagai hewan tingkat tinggi, eukariot dan prokariot yang mengkatalisis perubahan HMG-KoA ke mevalonat. Mevalonat akan diubah lebih lanjut pada berbagai tahapan selanjutnya sampai terbentuk kolesterol. Di dalam sel, konsentrasi mevalonat sangat ketat dikontrol melalui aktivitas HMG-KoA reduktase sehingga aktivitas HMG-KoA reduktase menjadi faktor penentu dalam sintesis kolesterol (Istvan *et al.* 2000).

Penghambatan terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase berpengaruh besar terhadap penurunan kolesterol total, LDL (*Low density lipoprotein*), trigliserida dan peningkatan HDL (*high density lipoprotein*). Penghambatan aktivitas HMG-KoA reduktase pada penderita moderat hiperkolesterolemia (kandungan kolesterol darah 200-300 mg/dL) mampu mengurangi kolesterol total (25-30%) dan LDL kolesterol (35%), bahkan mengurangi kematian pada kelompok tersebut sebesar 42% (Lyons & Harbinson 2009; Barrios-Gonzales & Miranda 2010). Statin merupakan komponen bioaktif yang efektif dalam menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase serta mereduksi kolesterol dalam darah. Statin mampu mereduksi aktivitas HMG-KoA reduktase sampai dengan 93% (Barrios-Gonzales & Miranda 2010). Selain statin beberapa peptida juga terbukti mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase, namun dengan daya inhibisi lebih rendah dari statin, yaitu sebesar 40% (Kato *et al.* 2009). Beberapa peptida yang mampu menurunkan kolesterol dan aktivitas enzim HMG-KoA reduktase adalah peptida hasil ekstraksi herbal *Senna obtusifolia* (Chuhua *et al.* 2008), peptida dari kentang dan kedelai (Liyanage *et al.* 2008), peptida dari susu dengan susunan asam amino Ile-Ile-Ala-Glu-Lys (Kirana *et al.* 2005) serta peptida sintetik dengan susunan asam amino yaitu Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg (Sharifov *et al.* 2011).

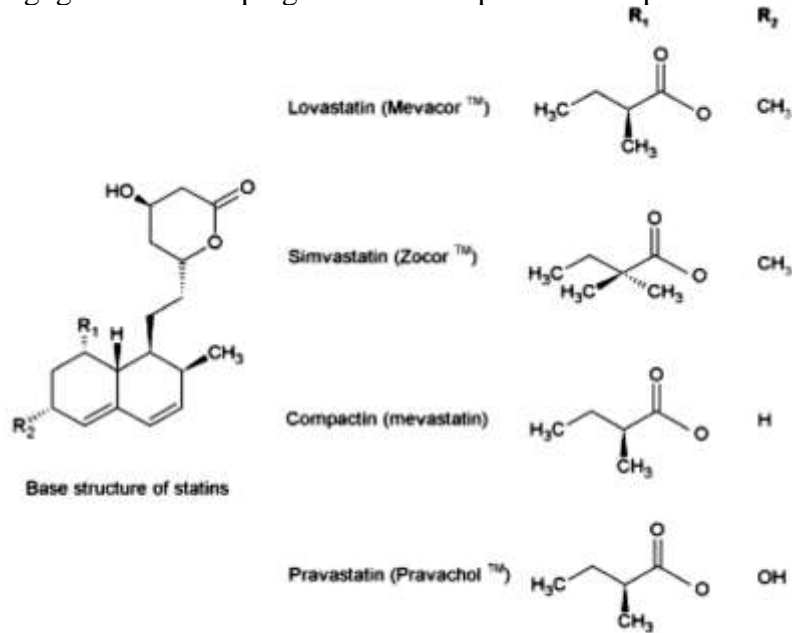
Statin sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase

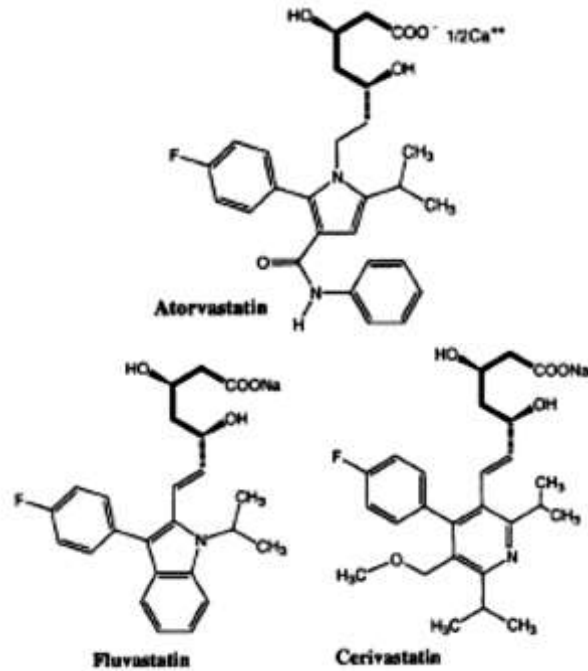
Statin merupakan kelompok obat-obatan yang menghambat sintesis kolesterol dengan melakukan penghambatan/pembatasan terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Statin pertama ditemukan oleh Endo pada tahun 1976, yang merupakan hasil metabolit *Penicillium citrinum* dan diberi nama mevastatin/compactin. Compactin merupakan komponen penghambat enzim yang diekstrak dari hati (HMG-KoA reduktase). Namun mevastatin/compactin tidak dipergunakan dan diperdagangkan, karena uji lanjut menyebutkan bahwa keduanya mempunyai efek negatif bagi manusia yaitu menyebabkan tumor, kerusakan otot bahkan kematian pada hewan percobaan (Barrios-Gonzales & Miranda 2010). Kajian statin lebih lanjut menghasilkan pravastatin yang merupakan produk turunan hasil hidrolisis dari compactin. Pravastatin diketahui lebih efisien dan aman dibandingkan dengan compactin. Selain pravastatin juga ditemukan lovastatin yang diperoleh dari *Aspergillus terreus*. Lovastatin diketahui lebih efisien dalam menghambat HMG-KoA reduktase dibandingkan compactin. *US Food and Drug*

administration (US FDA) menyetujui lovastatin untuk diperdagangkan setelah secara klinis lovastatin terbukti mereduksi LDL dan lebih aman digunakan pada manusia (Barrios-Gonzales & Miranda 2010). Pengembangan lebih lanjut terhadap lovastatin menghasilkan produk turunan lovastatin yaitu simvastatin. Hasil uji klinis menunjukkan bahwa simvastatin efisien mengurangi kolesterol total sebesar 25% dan menurunkan LDL sebesar 35%, bahkan mengurangi kematian sebanyak 42%.

Uji klinis terhadap statin memperoleh hasil menggembirakan dan menyebabkan berkembangnya produksi statin sintesis. Istvan & Deisenhofer (2001), mengelompokkan statin ke dalam 2 tipe yaitu statin tipe 1 dan statin tipe 2. Statin tipe 1 adalah statin yang disintesis secara alami oleh berbagai mikroorganismenya, yang termasuk statin tipe 1 ini adalah compactin, lovastatin, pravastatin, dan simvastatin. Statin tipe 2 adalah statin buatan (sintesis), yang termasuk tipe 2 ini adalah fluvastatin, cerivastatin, atorvastatin dan resuvastatin.

Struktur statin tipe 1 berbeda dengan statin tipe 2, namun keduanya mempunyai bagian yang mirip dengan substrat HMG-KoA. Perbedaan mendasar antara lovastatin, simvastatin, compactin dan pravastatin yang tergolong statin tipe 1 terletak pada gugus rantai samping R1 dan R2 seperti terlihat pada Gambar 5.





Gambar 5 Struktur dasar dan perbedaan berbagai statin (Barrios Gonzales & Miranda 2010, Dansette *et al.* 2000; Tobert 2003)

Statin dihasilkan oleh berbagai mikroorganisme, baik kapang maupun bakteri. Berbagai jenis statin dan produsennya dapat dilihat pada Tabel 2. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa terdapat kesamaan jalur biosintesis statin yaitu pada compactin dan lovastatin. Studi pada *Penicillium citrinum* dan *Monascus ruber* menunjukkan jalur pembentukan yang sama antara lovastatin dan compactin melalui *polyketide pathway*, sedangkan pravastatin dan simvastatin masing-masing merupakan turunan dari compactin dan lovastatin yang dihasilkan oleh bakteri. Beberapa mikroorganisme yang dapat mensintesis lovastatin adalah *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *M. purpureus*, *M. angkak*, sedangkan compactin diproduksi oleh *Penicillium citrinum*. Optimalisasi produksi lovastatin pada *Aspergillus terreus* dengan perlakuan inkubasi 8 hari, pH media 8.5, penambahan metionina 2 g/L menghasilkan lovastatin lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan asam amino lainnya yaitu sebesar 169 µg/mL. Kondisi inkubasi dengan tanpa aerasi menghasilkan lovastatin lebih tinggi sebesar 160 µg/mL dibandingkan dengan aerasi sebesar 120 µg/mL (Osman *et al.* 2011). Peningkatan produksi lovastatin pada *A. terreus* selama proses fermentasi membutuhkan nutrisi penting. Sumber karbon dan nitrogen sangat penting dalam produktivitas fermentasi untuk meningkatkan biomassa lovastatin. *A. terreus* menggunakan gliserol dan glukosa sebagai sumber karbon terbaik untuk produksi lovastatin. Inkubasi selama 7 hari pada 30°C dan pH 7.5-8.5 merupakan kondisi terbaik untuk produksi lovastatin (Osman *et al.* 2011).

Shaligram *et al.* (2009) melakukan optimasi produksi compactin dengan berbagai perbedaan perlakuan yaitu perbedaan waktu fermentasi, sumber karbon, sumber nitrogen anorganik, sumber nitrogen organik, dan perbedaan pH. Waktu fermentasi optimum dihasilkan oleh fermentasi selama 168 jam dengan sumber

karbon gliserol pada 22%, dan pH 6.5. Penambahan sumber nitrogen organik maupun anorganik tidak mempengaruhi produksi compactin.

Tabel 2 Statin dan sumber produksinya

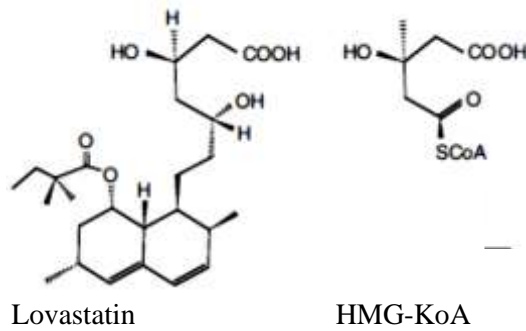
| No | Jenis Statin | Sumber (Mikroorganisme/Sintesis) |
|----|---|--|
| 1 | Mevastatin | <i>Penicillium citrinum</i> |
| 2 | Compactin | <i>Penicillium citrinum</i> <i>P. brevicompactum</i> |
| 3 | Lovastatin | <i>Aspergillus terreus</i> ; <i>Monascus ruber</i> ; <i>M. purpureus</i> <i>M. pilosus</i> , <i>M. vitreus</i> |
| 4 | Pravastatin (Produk turunan compactin) | <i>Streptomyces carbophilus</i> ; <i>Actinomadura sp.</i> <i>Bacillus megaterium</i> ; <i>Nocardia autrophica</i> |
| 5 | Simvastatin (Produk turunan lovastatin) | <i>Aspergillus terreus mutan</i> |

Sumber: Barrios-Gonzales & Miranda 2010

Skrining untuk memperoleh kapang penghasil lovastatin dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu deteksi secara langsung produksi lovastatin pada kultur kapang (Osman *et al.* 2011), skrining terhadap kapang yang memiliki kemampuan penghambatan terbesar terhadap *Candida albicans* (Ferron *et al.* 2005), serta skrining terhadap mikroorganisme yang resisten/tahan terhadap statin (Lin *et al.* 2011).

Selama ini skrining terhadap mikroorganisme penghasil statin banyak bersumber dari kapang yang tumbuh di angkak. Angkak merupakan beras merah yang difermentasi oleh kapang dan banyak digunakan sebagai obat atau nonpangan. Beberapa produk pangan terfermentasi diketahui mampu menurunkan kolesterol, oleh karena sangat memungkinkan untuk mengisolasi mikroorganisme dari produk-produk fermentasi Indonesia yang terindikasi mampu menurunkan kolesterol seperti bekasam.

Statin dapat berfungsi sebagai inhibitor efektif HMG-KoA reduktase ketika cincin lakton statin dalam bentuk terbuka yang strukturnya mirip dengan substrat HMG-KoA dalam biosintesis kolesterol sebagaimana terjadi dalam hati manusia (Gambar 6). Semua statin berperan dalam penghambatan pada bagian pengikatan HMG terutama grup hidrofobik statin berikatan kovalen dengan bagian HMG enzim (Seenivasan *et al.* 2008).

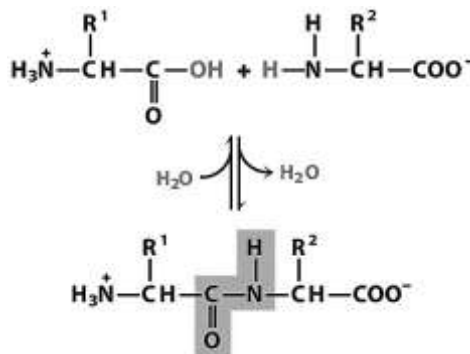


Gambar 6 Persamaan struktur lovastatin dan HMG-KoA (Friensen & Rodwell 2004)

Menurut Chakravarti & Sahai (2004), statin memiliki tiga mekanisme dalam mengontrol kolesterol darah yaitu (1) menurunkan LDL kolesterol dengan mekanisme meningkatkan katabolisme LDL, meningkatkan pemindahan atau pembuangan LDL, dan mengurangi produksi VLDL. (2) menurunkan trigliserida dan (3) meningkatkan HDL. Penghambatan terhadap HMG-KoA reduktase akan menghambat sintesis kolesterol di hati, hal ini menurunkan kadar LDL plasma dan lebih lanjut menginduksi peningkatan reseptor LDL. Efek tersebut meningkatkan kecepatan katabolisme LDL maupun ekstraksi prekursor LDL oleh hati, sehingga mengurangi simpanan LDL plasma, mengurangi trigliserida plasma dan sedikit meningkatkan HDL (Chakravarti & Sahai 2004).

Peptida sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase

Peptida merupakan molekul yang terbentuk dari 2 atau lebih asam amino. Ikatan peptida terjadi jika atom nitrogen pada salah satu asam amino berikatan dengan gugus karboksil dari asam amino lain (Gambar 7) Peptida terdapat pada semua makhluk hidup dan berperan dalam beberapa aktivitas biokimia diantaranya sebagai enzim, hormon dan antibiotik.



Gambar 7 Struktur peptida

Peptida bioaktif merupakan fragmen protein spesifik yang memiliki dampak positif pada fungsi atau kondisi tubuh. Beberapa pengkajian fungsi protein dan peptide dalam menurunkan kolesterol telah banyak dilakukan. Hasil uji *in vivo* pada tikus betina tanpa ovarium (*ovariectomised rat*) dengan memberikan ransum berisi peptida dari protein ikan tak larut air (*water insoluble fish protein*) selama 28 hari terbukti dapat menurunkan kolesterol total pada plasma dari 3.36 mmol/L menjadi

2.75 mmol/L. Lebih lanjut uji terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase menyebutkan bahwa peptida dari protein ikan yang tak larut air mampu mereduksi aktivitas enzim HMG-KoA reduktase antara 29 - 41%. Analisis terhadap asam amino pada peptida dari protein ikan yang tak larut air menghasilkan komposisi asam amino Met, Cys, Gly, Lys, Arg, Val, Leu, Ile, His, Tyr, Phe, Thr, Ser, Ala, Asp, dan Glu (Kato *et al.* 2009).

Peptida dari protein kentang dan kedelai mengandung komposisi asam amino Asp, Thr, Ser, Glu, Gly, Cys, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys, His, Arg, Ala dan Pro, terbukti menurunkan kolesterol darah (Liyanage *et al.* 2008). Konsumsi ransum yang mengandung peptida dari kedelai selama 4 minggu mampu menurunkan kolesterol total 9,8% dan kolesterol non HDL 10%, sedangkan penggunaan peptida dari kentang pada ransum mampu menurunkan kolesterol total dalam plasma sebesar 4.3% dan kolesterol non HDL 15%.

Chuhua *et al.* 2008 berhasil menemukan peptida baru dari herbal *Senna obtusifolia* yang memiliki kemampuan menghambat sintesis kolesterol. Uji pada kultur sel *Chinese Hamster Oocytes* (CHO) pada media *amphoterin* sel B menunjukkan bahwa peptida yang memiliki berat molekul 19.7 kD dengan susunan asam amino pada terminal N yaitu IPYISASFPLNIEFPSE (Ile-Pro-Tyr-Ile-Ser-Ala-Ser-Phe-Pro-Leu-Asn-Ile-Glu-Phe-Pro-Ser-Glu) memiliki daya hambat yang tinggi terhadap sintesis kolesterol. Peptida ini memiliki struktur 12.5% α -heliks, 55.6% β -sheet, dan 31.6% random.

Pentapeptida yang dihasilkan dari *bovine milk* β laktoglobulin dari susu sapi dengan susunan asam amino Ile-Ile-Ala-Glu-Lys mampu mereduksi kolesterol darah (Kirana *et al.* 2005). Selain itu pemberian penta peptida (Trp-Phe-Ile-Leu-Lys) dari susu kedelai terbukti secara *in vivo* menurunkan kadar kolesterol total, LDL dan trigliserida serta meningkatkan kadar HDL pada tikus hiperkolesterolemia (Afifah 2011). Peptida sintesis dengan susunan asam amino Leu-Arg-Lys-Leu-Arg-Lys-Arg-Leu-Leu-Arg mampu mereduksi LDL dan menurunkan level kolesterol plasma darah secara *in vivo* (Gupta *et al.* 2005; Sharifov *et al.* 2011).

Fermentasi produk perikanan menghasilkan peptida yang merupakan hasil pemecahan protein oleh enzim dari mikroorganisme maupun dihasilkan oleh mikroorganisme itu sendiri selama proses fermentasi. Mengingat bekasam merupakan produk fermentasi yang mirip dengan *heshiko* dan *narezushi* yang mampu menurunkan kolesterol, maka kajian lebih lanjut keberadaan peptida sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase selain statin dalam bekasam dan mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi bekasam perlu dilakukan.

3 METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dari Bulan April 2013 sampai Bulan Februari 2015. Tempat penelitian yaitu di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi IPB Bogor, Laboratorium Mikrobiologi SEAFast Center IPB, Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Kimia Pangan, serta Laboratorium Analisis Pangan Terakreditasi dan Instrumen Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

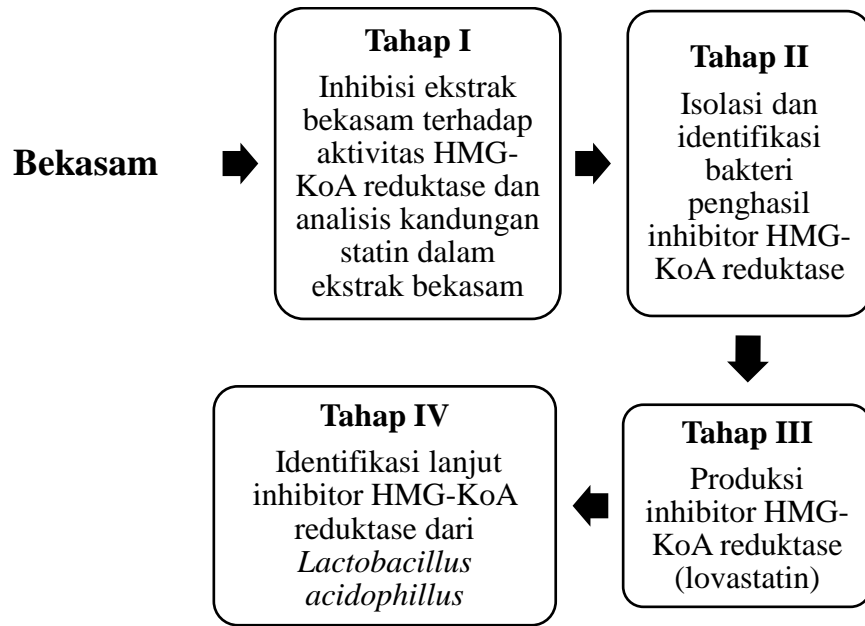
Bahan dan Alat Penelitian

Bahan utama yang digunakan terdiri dari 5 jenis bekasam yang berasal dari 5 produsen berbeda di daerah Kayu Agung, Ogan Komering Ilir Sumatera Selatan, dimana 2 produsen menggunakan bahan baku ikan gabus (*Channa striata*) yaitu bekasam A1 dan A2, serta 3 produsen menggunakan bahan ikan seluang (*Rasbora* sp) yaitu bekasam B1, B2 dan B3. Bahan utama lainnya adalah media *de Man Rogosa Sharp broth* (Oxoid, England), Mevastatin/compactin, lovastatin, pravastatin, simvastatin (Sigma-Aldrich), KIT HMG-KoA reductase (Sigma-Aldrich, USA), API 50CH dan API 50CHL (Biomerieux, Jerman), *Low Range Protein Ladder* (Thermo Scientific, Lithuania), bahan kimia lain untuk ekstraksi bekasam, analisis statin dan SDS PAGE.

Alat utama yang digunakan adalah *UV-Vis Spectrophotometer* 1240 (Shimadzu), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, Agilent 1200 series), sentrifugasi dengan pendingin, inkubator, membran filter 0.45 μ m (Biotechlab, Bulgaria), membran filter 0.02 μ m (Whatman, Germany), *molecular weight cut off* (MWCO) 10 K dan 3 K (Thermo-Scientific, UK) serta alat SDS PAGE.

Tahapan Penelitian

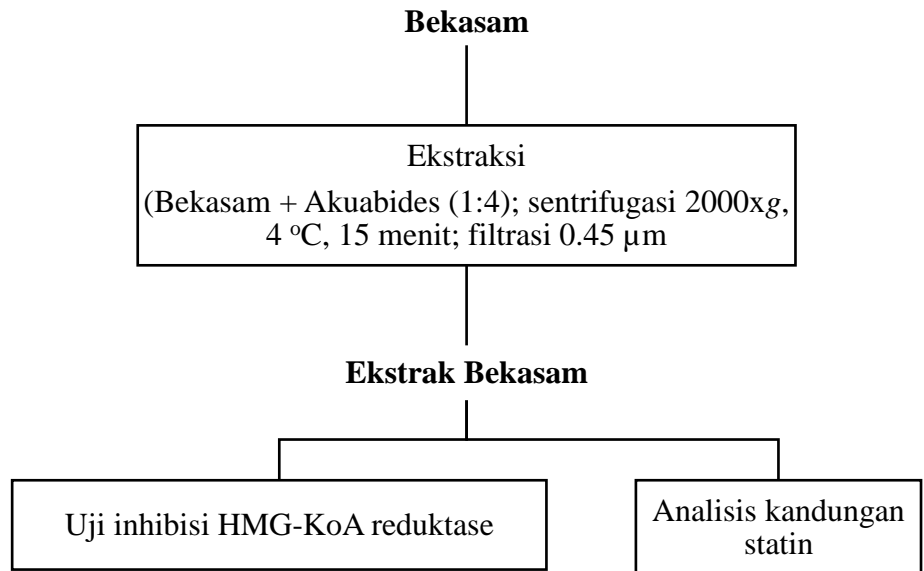
Penelitian dilakukan dalam 4 tahapan, yaitu tahap pertama mengetahui kemampuan ekstrak bekasam dalam menghambat enzim HMG-KoA reduktase serta mengetahui keberadaan statin dalam bekasam. Tahap kedua melakukan isolasi dan skrining bakteri penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase. Tahap ketiga melakukan produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dan tahap keempat identifikasi lanjut komponen bioaktif penghambat HMG-KoA reduktase. Diagram alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 8 berikut ini.



Gambar 8 Tahapan penelitian

Penelitian Tahap Pertama

Penelitian tahap pertama adalah mengetahui kemampuan ekstrak bekasam dalam menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase sebagai enzim utama dalam biosintesis kolesterol (Gambar 9).



Gambar 9 Diagram alir penelitian tahap I

Analisis inhibisi ekstrak bekasam terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase

Sebanyak 10 g bekasam dihomogenisasi dengan 40 mL akuabides. Homogenat disentrifugasi pada 2000 x g, 4 °C selama 15 menit dan supernatan dipisahkan. Sebanyak 50 mL akuabides ditambahkan ke dalam presipitat dan disentrifugasi kembali. Supernatan 1 dan 2 dicampur dan disaring menggunakan kertas saring dan membran filter 0.45 µm. Filtrat dilarutkan dalam 200 mL akuabides sehingga diperoleh ekstrak bekasam (Itou & Akahene 2009; 2010).

Hasil ekstraksi bekasam digunakan untuk analisis penghambatan aktivitas enzim HMG-KoA reduktase menggunakan *KIT* HMG-KoA reduktase CS1090 (Sigma-Aldrich). Prosedur uji dilakukan dengan mengikuti instruksi sesuai dengan prosedur dari Sigma-Aldrich. Semua pereaksi yang digunakan (Enzim HMG-KoA reduktase, buffer, NADPH, subtrat HMG-KoA, dan pravastatin dicairkan dalam refrigerator ataupun dalam es untuk menjaga suhu tetap dingin, sebelum dimulai spektrofotometer diatur pada panjang gelombang 340 nm. Pereaksi ditambahkan sesuai dengan prosedur seperti yang terlihat pada Tabel 3 dengan total masing-masing (blanko, uji aktivitas enzim, dan uji inhibisi sampel) sebanyak 1000µL atau 1 mL. Pravastatin digunakan sebagai inhibitor kontrol terhadap HMG-KoA reduktase. Setiap 1 mL sampel, dibaca dengan spektrofotometer (340 nm) setiap 25 detik selama 6 menit (Lachenmeier *et al.* 2012).

Tabel 3 Volume pereaksi uji inhibitor HMG-KoA reduktase

| Sampel | Buffer | Inhibitor | NADPH | Subtrat HMG-KoA | Enzim HMG-KoA |
|---------------------------------|--------|-----------|-------|-----------------|---------------|
| Blanko | 920 µL | - | 20 µL | 60 µL | - |
| Aktivitas | 915 µL | - | 20 µL | 60 µL | 5 µL |
| Inhibisi Pravastatin/ sampel | 910 µL | 5 µL | 20 µL | 60 µL | 5 µL |

Aktivitas enzim dihitung dengan persamaan:

$$\text{Unit/mgProtein} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min}_{\text{sampel}} - \Delta A_{340}/\text{min}_{\text{blank}}) \times TV}{12.44 \times V \times 0.6 \times LP}$$

Keterangan:

12.44 = 2 kali kebutuhan NADPH selama reaksi. (Koefisien untuk NADPH pada 340 nm adalah 6.22/mM.cm).

TV = Volume total reaksi (1 mL)

V = Volume enzim yang digunakan

0.6 = Konsentrasi enzim dalam mg-protein (mgP)/mL

LP = *Light path* (1 untuk *cuvettes*)

Analisis kandungan statin pada ekstrak bekasam

Analisis kandungan statin dalam ekstrak bekasam adalah sebagai berikut: sebanyak 1 ml ekstrak bekasam dilarutkan dalam 9 mL metanol dan disentrifugasi kembali pada 2000 x g, 4 °C selama 15 menit. Supernatan sebanyak 1 mL dilarutkan kembali dalam metanol (9mL) dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 238 nm menggunakan spektrofotometer untuk menentukan kandungan statin. Standar statin yang digunakan adalah lovastatin, compactin, simvastatin, dan pravastatin dari Sigma Aldrich yang dibuat dengan kisaran 0 sampai 60 µL (Reddy *et al.* 2011; Mahesh *et al.* 2012 dan Harsha *et al.* 2013). Data pada penelitian tahap pertama dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui dan menggambarkan keberadaan inhibitor HMG-KoA reduktase dan daya inhibisinya.

Penelitian Tahap Kedua

Penelitian yang dilakukan pada tahap kedua meliputi isolasi mikroorganisme dari bekasam yang resisten terhadap statin (lovastatin/compactin), skrining bakteri penghasil statin dari mikroorganisme yang resisten terhadap statin, analisis inhibisi hasil metabolit mikroorganisme penghasil statin terhadap enzim HMG-KoA reduktase serta identifikasi mikroorganisme dengan daya inhibisi terhadap enzim HMG-KoA reduktase yang terbesar (Gambar 10). Analisis kandungan statin menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan HPLC, sedangkan analisis inhibisi HMG-KoA reduktase menggunakan KIT HMG-CoA Reduktase (Sigma Aldrich) dan spektrofotometer.

Isolasi dan skrining bakteri penghasil statin

Skrining bakteri penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase dilakukan menggunakan compactin/lovastatin sebagai penseleksi dalam media kultur bakteri (MRS). Bakteri yang tahan terhadap compactin atau lovastatin kemungkinan mampu menghasilkan statin. Sebanyak 10 g bekasam dilarutkan dalam 90 mL akuades steril dan dihomogenisasi, 1 mL larutan berisi bakteri ditumbuhkan ke dalam 9 mL media MRS cair kemudian ditumbuhkan pada suhu 35 °C selama 48 jam. Setelah itu 1 mL kultur dipindahkan kedalam 9 mL media MRS cair berisi compactin 100 µg/mL atau lovastatin 1 mg/mL dan diinkubasi pada 35 °C selama 5 hari. Kultur yang berusia 5 hari diukur nilai *optical density* pada λ 620 nm untuk menentukan pertumbuhan kultur bakteri serta kultur bakteri yang paling tahan/resisten terhadap compactin/lovastatin. Semakin tinggi nilai OD menunjukkan bakteri semakin banyak yang tumbuh dan semakin tahan/resisten terhadap statin (Chen *et al.* 2006 dan Zhuge *et al.* 2008).

Kultur bakteri yang paling tahan dan dapat tumbuh dengan optimum, diremajakan dalam media MRS cair dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian, sebanyak 1 mL kultur yang berumur 24 jam dipindahkan dalam media MRS agar berisi compactin 150 µg/mL atau lovastatin 2 mg/mL dan diinkubasi pada 35 °C selama 2 hari untuk diseleksi kembali. Koloni bakteri yang tumbuh pada media MRS agar merupakan bakteri yang resisten terhadap statin. Bakteri yang resisten terhadap statin digunakan untuk uji produksi statin. Hasil produksi statin oleh kultur bakteri dianalisis menggunakan spektrofotometer dan HPLC.

Analisis kandungan statin

Kultur cair (5 mL) ditambah NaOH 0.2 N (5 mL), kemudian diaduk/dogoyang selama 1 jam dalam *rotary shaker*. Residu disaring secara bertahap dengan kertas saring dan membran filter 0.45 µm. Filtrat disentrifugasi pada 2000 x g, 4 °C selama 15 menit, kemudian supernatan dikumpulkan. Sebanyak 1 mL supernatan dilarutkan dalam 9 mL metanol, disentrifugasi kembali pada kondisi yang sama dan supernatan dianalisis dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 238 nm. Standar statin (compactin dan lovastatin) dari *Sigma Aldrich* dibuat dengan konsentrasi masing-masing 10, 20, 30, 50, dan 100 ppm.

Analisis menggunakan HPLC dilakukan terhadap 5 isolat bakteri terbaik yang menghasilkan statin berdasarkan analisis menggunakan spektrofotometer. Pada akhir fermentasi (5 hari), kultur ditambahkan dengan NaOH 0.2 N, dengan perbandingan kultur dan NaOH (1:6), kemudian diaduk/digoyang dalam *rotary shaker* selama 2 jam. Filtrat ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:9 (filtrat:metanol) dan disentrifugasi pada kecepatan 2000 x g, 4 °C selama 15 menit. Supernatan disaring menggunakan membran filter 0.45 µm dilanjutkan dengan sonikasi selama 15 menit. Supernatan dianalisis dengan HPLC (Agilent 1200 series). Fase gerak yang digunakan adalah metanol dan air (9:1), menggunakan kolom C-18, kecepatan alir 1 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 237 nm. Compactin dan lovastatin (*Sigma Aldrich*) digunakan sebagai standar dengan konsentrasi masing-masing 10, 20, 30, 50, dan 100 ppm (Abe *et al.* 2012). Konsentrasi statin (compactin dan lovastatin) pada sampel ditentukan dengan persamaan berikut:

$$[\text{statin}]_{\text{dalam sampel}} = \frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standar}} \times [\text{standar statin}]$$

$$[\text{statin}]_{\text{kultur bakteri}} = [\text{statin}]_{\text{sampel}} \times \text{faktor pengenceran}$$

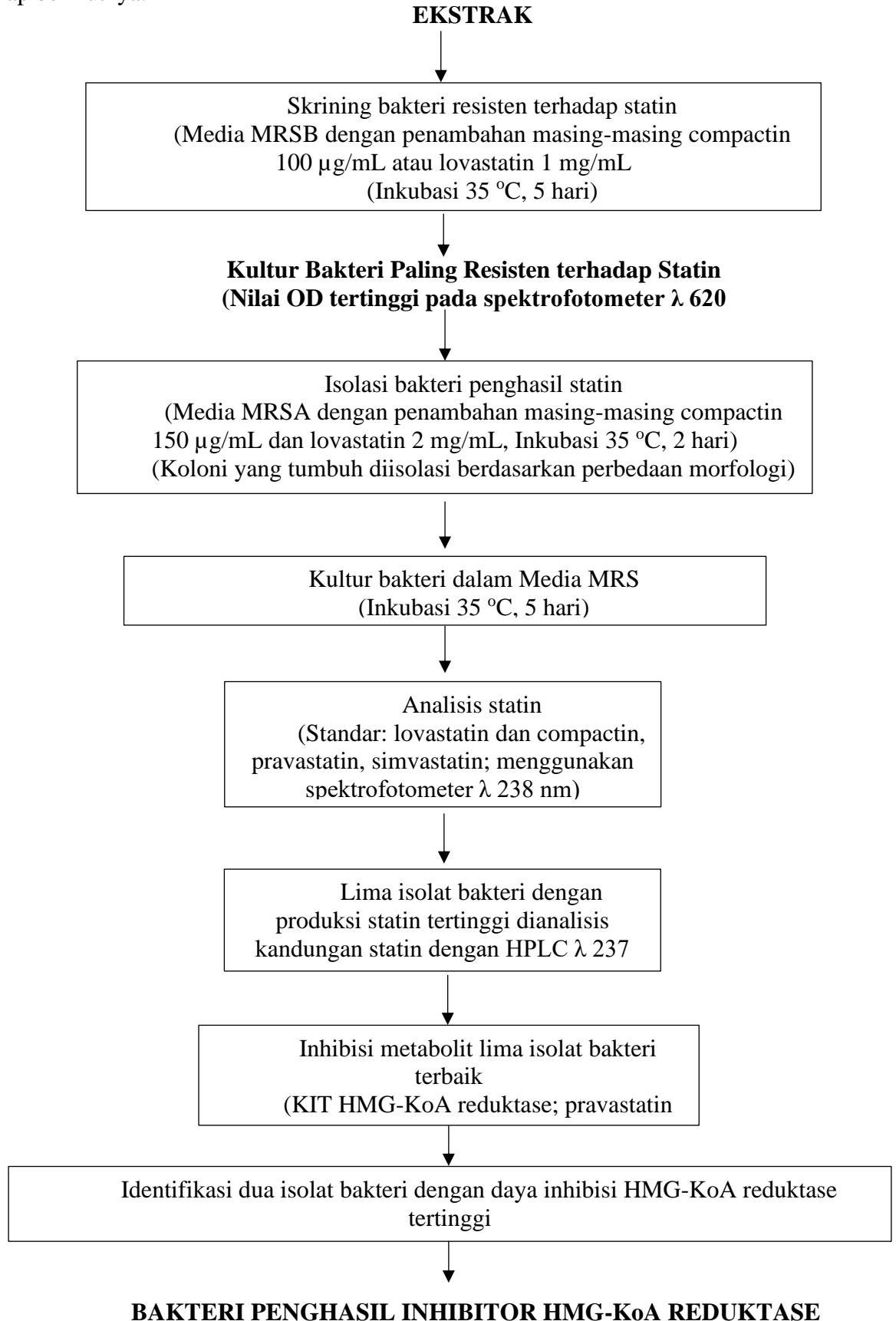
Analisis penghambatan ekstrak metabolit bakteri terhadap enzim HMG-KoA reduktase

Kultur cair disentrifugasi pada 2000 x g, selama 15 menit kemudian disaring dengan membran filter 0.45 µl. Supernatan dipisahkan, digunakan untuk analisis penghambatan kultur bakteri terhadap enzim HMG-KoA reduktase menggunakan KIT HMG-KoA reduktase CS1090. Prosedur uji dilakukan dengan mengikuti instruksi sesuai dengan prosedur dari Sigma-Aldrich seperti pada penelitian tahap pertama.

Identifikasi bakteri penghasil statin

Tahapan penelitian ini bertujuan mengetahui genus bakteri yang menghasilkan statin. Karakterisasi bakteri yang diamati meliputi bentuk dan pewarnaan Gram, uji katalase, uji motilitas serta uji pertumbuhan bakteri pada berbagai suhu. Identifikasi terhadap bakteri dilakukan dengan menggunakan 50 jenis gula yang menghasilkan asam dengan menggunakan kit mikrobiologi standar API 50CH dan API 50CHL.

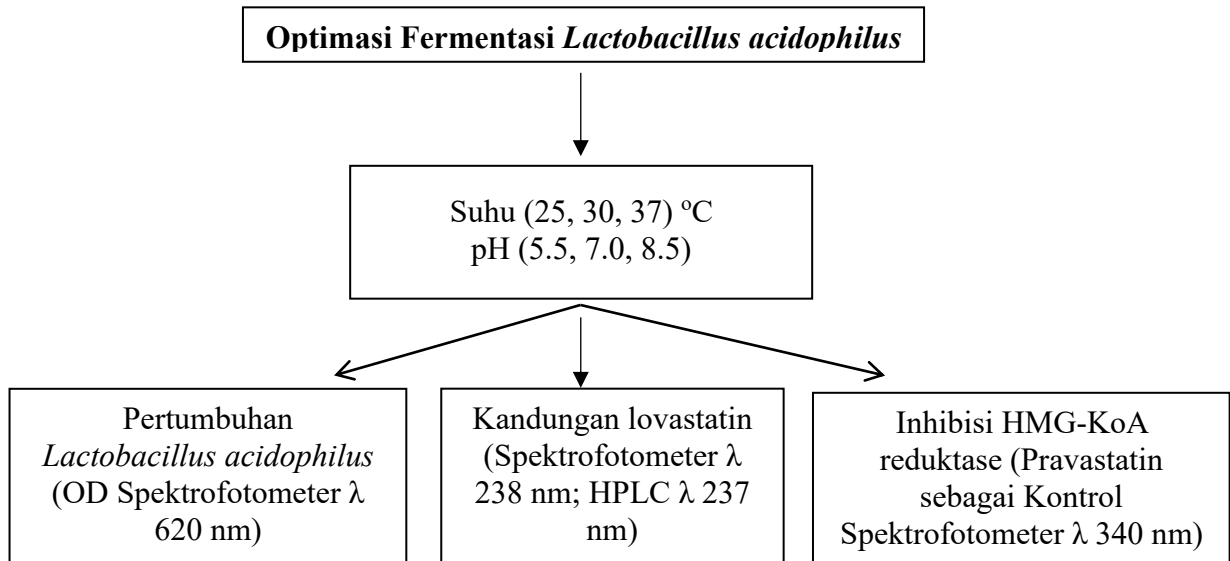
Data yang merupakan nilai rata-rata pada penelitian tahap kedua dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui dan menggambarkan mikroorganisme penghasil statin terbaik. Hasil penelitian tahap kedua digunakan untuk penelitian tahap berikutnya.



Gambar 10 Diagram alir penelitian tahap II

Penelitian Tahap Ketiga

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri yang diisolasi dari bekasam dengan daya inhibisi paling besar terhadap enzim HMG-KoA reduktase. Metode yang dilakukan dalam penelitian tahap ketiga ini adalah optimasi produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dengan variasi suhu inkubasi (25, 30, 37 °C), dan pH awal media (5.5, 7.0, 8.5). Pada masing-masing perlakuan diamati pertumbuhan bakteri, produksi lovastatin, serta daya inhibisi metabolit terhadap HMG-KoA reduktase. Analisis lovastatin menggunakan spektrofotometer UV-Vis serta analisis inhibisi HMG-KoA reduktase menggunakan KIT HMG-KoA Reduktase (Gambar 11).



Gambar 11 Diagram alir penelitian tahap III

Produksi inhibitor HMG-KoA reduktase dari *L. acidophilus* dengan variasi suhu dan pH inkubasi pada media MRS cair

Bakteri *L. acidophilus* ditumbuhkan dalam media *de Man Rogosa Sharpe* (MRS) cair. Kondisi kultur diatur dengan berbagai variasi perlakuan suhu inkubasi 25, 30, dan 37 °C. Suhu inkubasi terbaik yang menghasilkan kandungan lovastatin dan daya inhibisi HMG-KoA reduktase tertinggi digunakan untuk perlakuan produksi lovastatin dengan variasi pH 5.5; 7.0; dan 8.5 pada media MRS cair (Shaligram *et al.* 2009). Peningkatan jumlah sel selama masa inkubasi ditentukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (UV-Mini 1240, Shimadzu) dengan melihat nilai *optical density* (OD) pada λ 620 nm. Pada akhir masa inkubasi (5 hari) dilakukan pengukuran kandungan lovastatin menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 238 nm dan daya inhibisi terhadap enzim HMG-KoA reduktase.

Analisis Kandungan Lovastatin

Hasil penelitian pada tahap sebelumnya menunjukkan bahwa lovastatin merupakan jenis statin yang dihasilkan oleh *L. acidophilus*, oleh karena itu analisis

statin difokuskan pada lovastatin yang merupakan hasil metabolit *L. acidophilus*. Setelah 5 hari inkubasi dalam variasi perlakuan suhu, pH dan gliserol, sebanyak 5 mL kultur *L. acidophilus* dimasukkan ke dalam 20 mL metanol (Merck, Jerman) dan diaduk/goyang dalam *rotary shaker* selama 2 jam, kemudian disaring dengan membran filter 0.45 μm . Filtrat disentrifugasi pada 500 x g, 4 °C selama 15 menit dan supernatan dipisahkan. Sebanyak 0.5 mL supernatan ditambahkan dengan 0.5 mL asam trifluoroasetat (1%) (Sigma-Aldrich, USA), dihomogenisasi dengan vortek dan didiamkan selama 10 menit. Homogenat (0.5 mL) diambil dan dilarutkan dalam metanol 4.5 mL. Hasil larutan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 238 nm. Lovastatin (Sigma-Aldrich, USA) digunakan sebagai standar dengan kosentrasi 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm (Osman *et al.* 2011). Analisis Lovastatin menggunakan HPLC seperti yang disebutkan pada tahapan sebelumnya.

Daya Inhibisi komponen bioaktif dari *L. acidophilus*

Kultur *L. acidophilus* yang telah diinkubasi selama 5 hari disentrifugasi pada kecepatan 2000 x g, 4 °C selama 15 menit. Supernatan disaring menggunakan membran filter 0.45 μm . Filtrat digunakan untuk uji inhibisi HMG-KoA reduktase mengikuti pedoman KIT HMG-KoA reduktase (Sigma Aldrich, USA) seperti pada tahapan penelitian sebelumnya. Data hasil penelitian tahap ketiga dianalisis menggunakan Analisis varian (ANOVA) menggunakan Minitab 16 dengan $P < 0.05$.

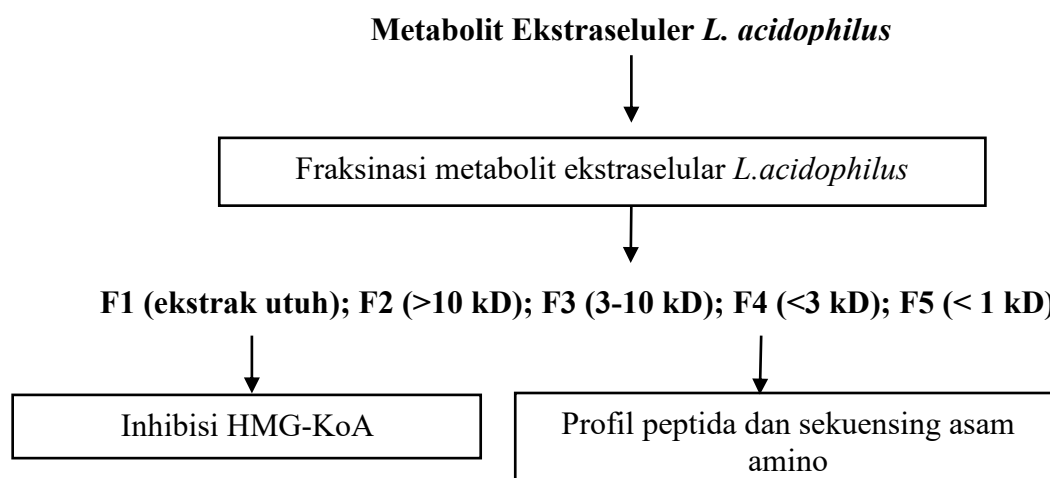
Penelitian Tahap Keempat

Fraksinasi berdasarkan berat molekul dilakukan untuk memisahkan metabolit yang mengandung lovastatin dengan berat molekul <500 dalton dengan peptida dengan berat molekul > 3 kD. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan ultrafiltrasi MWCO 10 K, 3 K dan membran filter 0.02 μm , sehingga diperoleh 5 fraksi berupa fraksi metabolit utuh (F1), fraksi metabolit dengan BM>10 kD (F2), fraksi metabolit dengan BM 3 – 10 kD (F3), fraksi metabolit dengan BM < 3 kD (F4) dan fraksi metabolit dengan BM < 1 kD (F5). Metabolit yang mengandung lovastatin berada pada fraksi no. 5. Kandungan lovastatin dianalisis menggunakan HPLC, analisis inhibisi HMG-KoA reduktase menggunakan spektrofotometer, profil peptida masing-masing fraksi dianalisis menggunakan SDS PAGE *silver staining*. Peptida yang mempunyai aktivitas inhibisi terhadap HMG-KoA reduktase disekuensing untuk mengetahui jenis proteinnnya. Diagram alir penelitian tahap IV dapat dilihat pada Gambar 12.

Fraksinasi komponen bioaktif *L. acidophilus* dan daya inhibisi terhadap HMG-KoA reduktase

Tujuan fraksinasi adalah untuk memisahkan lovastatin dan komponen bioaktif lain (peptida) serta menguji daya inhibisi keduanya terhadap HMG-KoA reduktase. Fraksinasi dilakukan berdasarkan perbedaan berat molekul yaitu F1 (hasil metabolit utuh), F2 (berat molekul lebih dari 10 kD), F3 (BM antara 3-10 kD), F4 (BM < 3 kD) dan F5 (BM < 1 kD). Fraksi F1 diperoleh dengan melakukan

penyaringan kultur bakteri *L. acidophilus* yang berumur 5 hari menggunakan membran filter 0.45 μm . Fraksi F2 diperoleh dengan melakukan penyaringan menggunakan MWCO 10 K yang disentrifugasi pada 3300 x g, 4 °C selama 3 menit. Supernatan (pada tabung bagian atas) yang dihasilkan merupakan fraksi F2 dengan berat molekul > 10 kD sedangkan filtrat (tabung bagian bawah) digunakan untuk pemisahan fraksi F3 dengan menggunakan MWCO 3 K dan disentrifugasi kembali pada 3300 x g, selama 3 menit yang menghasilkan fraksi dengan berat molekul 3-10 kD pada bagian atas (fraksi F3) dan berat molekul < 3 kD di bagian bawah yang merupakan fraksi F4. Fraksi F5 disaring kembali menggunakan membran filter 0.02 μm untuk memperoleh fraksi F5 dengan berat molekul <1 kD. Masing-masing fraksi digunakan untuk pengujian inhibisi terhadap HMG-KoA reduktase menggunakan KIT HMG-KoA reduktase.



Gambar 12 Diagram alir penelitian tahap IV

Analisis peptida dengan SDS PAGE

Sebelum diamati menggunakan SDS PAGE, persiapan terhadap peptida *L. acidophilus* adalah sebagai berikut: masing-masing fraksi sebanyak 1000 μL ditambahkan dengan 100 μL TCA divorteks dan disentrifugasi pada 3300 x g, 4 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambah dicuci/dibilas dengan aseton 100 μL sebanyak 2 kali. Endapan ditambah dengan buffer sampel, divorteks kembali dan dipanaskan selama 5 menit pada 100 °C. Kemudian profil peptida *L. acidophilus* diamati menggunakan Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) menggunakan gel 18%. Fraksi protein dari ekstrak kultur *L. acidophilus* masing-masing sebanyak 18 μL dimasukkan ke dalam gel dan dielektroforesis dalam buffer yang terdiri dari: 24.8 mM Tris, 192 mM glisin, 0.1% SDS pada pH 8.3. Marker standar dengan berat molekul rendah (Thermoscientific, Lithuania) dimasukkan ke dalam gel sebagai pembanding. Setelah elektroforesis gel diwarnai (*staining*) menggunakan metode *silver staining*. Gel dimasukkan dalam larutan fiksasi yang terdiri dari 25% metanol dan 12% asam asetat selama 1 jam, dilanjutkan dengan dimasukkan kembali dalam 50% etanol, selama 20 menit dan 30% etanol selama 2 x 20 menit dan dimasukkan ke dalam larutan *enhancer* ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) dan dibilas dengan akuades. Setelah itu dimasukkan ke dalam

larutan silver nitrat selama 30 menit dan dicuci kembali dengan akuades 2 x 20 detik. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan *developer* (Na₂CO₃ dan formaldehida) dan terakhir direndam dalam larutan fiksasi kembali (Giri *et al.* 2012).

Persiapan terhadap pengamatan peptida bekasam adalah sebagai berikut: ekstrak bekasam dari tahapan sebelumnya yang telah disaring dengan membran filter 0.45 µm ditambahkan dengan 100 µL TCA divorteks dan disentrifugasi pada 3300 x g, 4 °C selama 20 menit. Supernatan dibuang dan endapan ditambah dicuci/dibilas dengan aseton 100 µL sebanyak 2 kali. Endapan ditambah dengan buffer sampel, divorteks kembali dan dipanaskan selama 5 menit pada 100 °C, kemudian digunakan untuk analisis SDS PAGE seperti pada metabolit *L. acidophilus*. Setelah elektroforesis gel di *staining* menggunakan metode *comasive blue* dengan tahapan Gel direndam di dalam 20 mL larutan *staining* sambil digoyang dengan shaker selama 20 menit. Larutan *staining* terdiri dari *comasie blue* R-250 1 g/L, metanol 450 mL/L, aquades 450 mL/L, dan asam asetat glasial 100 mL/L. Gel dicuci dalam 150 mL asam asetat/larutan TCA 12.5%. Kemudian gel direndam dalam larutan *destaining* sambil digoyang selama 20 menit dan dicuci dengan asam asetat/larutan TCA 12.5% sampai bening. Larutan *destaining* terdiri dari metanol 100 mL/L, asam asetat glasial 100 mL/L dan aquades 800 mL/L.

Sekuensing dan Pemodelan Peptida Inhibitor HMG-KoA Reduktase

Pita peptida pada gel yang mempunyai daya inhibisi besar terhadap HMG-KoA reduktase dipisahkan dengan cara memotong lapisan peptida dari lempengan gel. Satu pita peptida yang terpisah dikirim ke *Proteomich International Pty Ltd* untuk dianalisa lebih lanjut susunan asam aminonya. Tahapan dalam metode ini termasuk pemotongan protein sampel dengan tripsin. Peptida dianalisis dengan *electrospray ionisation mass spectrometry* menggunakan Agilent 1260 Infinity HPLC system (Agilent) digabung dengan Agilent 6540 mass spectrometer (Agilent). Peptida disuntikan ke dalam kolom C18 300 SB, 5 µm (Agilent) dan dipisahkan dengan larutan air/asetonitril/0.1% asam format (v/v). Spektra dianalisis untuk mengidentifikasi peptida menggunakan *Mascot sequence matcing software* (Matrix Science) dengan Ludwig NR (www.proteomics.com.au) untuk mengetahui homologi peptida yang diperoleh dengan peptida dari bakteri *L. acidophilus* lainnya. Model molekul peptida dilihat menggunakan SWISS-MODEL dalam www.expasy.org dan program RasMol.

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

Bekasam sebagai Sumber Inhibitor HMG-KoA Reduktase

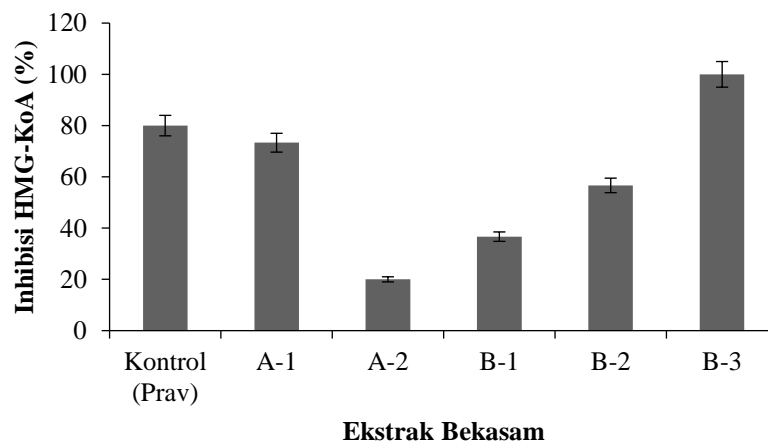
Daya Inhibisi Ekstrak Bekasam terhadap Aktivitas Enzim HMG-KoA Reduktase

Bekasam merupakan bahan pangan hasil fermentasi yang mempunyai citarasa asam akibat akumulasi asam laktat sebagai produk metabolit bakteri asam laktat. Nilai pH bekasam yang dianalisis berkisar pada 4.52 – 5.72, dan rata-rata bekasam ikan seluang lebih asam dibandingkan dengan bekasam ikan gabus. Sampel bekasam dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13 Bekasam ikan gabus (A) dan Bekasam ikan seluang (B)

Hasil analisis inhibisi ekstrak bekasam terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase menunjukkan bahwa lima jenis bekasam memiliki daya inhibisi HMG-KoA reduktase berkisar pada rentang nilai 36 – 100% dengan pravastatin sebagai kontrol (80%). Ekstrak bekasam dari ikan seluang memiliki nilai rata-rata inhibisi HMG-KoA reduktase yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak bekasam ikan gabus, dengan nilai rata-rata berturut-turut adalah 64.44% dan 46.66% (Gambar 14).



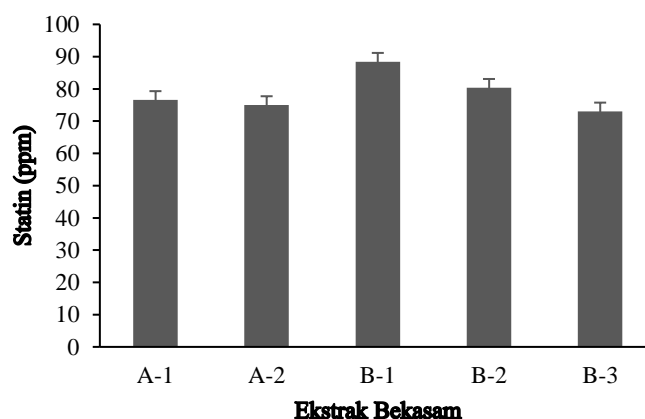
Gambar 14 Inhibisi ekstrak bekasam terhadap enzim HMG-KoA reduktase.

Pravastatin (Prav) sebagai kontrol, A-1 dan A-2 merupakan bekasam ikan gabus, B-1, B-2 dan B-3 merupakan bekasam ikan seluang.

Adanya inhibisi ekstrak bekasam terhadap HMG-KoA reduktase menunjukkan keberadaan komponen bioaktif pada ekstrak bekasam yang berfungsi sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase. Rata-rata daya inhibisi HMG-KoA reduktase dari ekstrak bekasam ikan seluang lebih tinggi dibandingkan dengan inhibisi ekstrak bekasam ikan gabus, hal ini dipengaruhi oleh komponen bioaktif inhibitor HMG-KoA reduktase pada ekstrak bekasam. Menurut Barrios-Gonzales & Miranda (2010), komponen bioaktif utama yang berfungsi sebagai inhibitor pada HMG-KoA reduktase adalah golongan statin seperti lovastatin, compactin, pravastatin, dan simvastatin. Kandungan rata-rata statin dalam ekstrak bekasam ikan seluang lebih tinggi dibandingkan dengan statin dalam ekstrak bekasam ikan gabus (Gambar 15). Kondisi ini dipengaruhi oleh perbedaan kandungan asam amino dalam ikan seluang dan ikan gabus, yaitu kandungan metionina dalam ikan seluang sebesar 1.64% (Screenivasan & Natarajan, 1966), lebih tinggi dibandingkan dengan kandungan metionina dalam ikan gabus yaitu sebesar 0.18-0.23% (Mustafa *et al.* 2012; Yuniarti *et al.* 2013). Biosintesis statin memerlukan asam amino metionina, yaitu pada tahap awal jalur biosintesis statin, monakolin-L dibentuk dari 9 molekul asetat dan 1 metionina, kemudian gugus metil dalam statin yang berada dalam rantai samping (C6) dibentuk dari 2 asetat dan 1 metionina (Seenivasan *et al.* 2008).

Kandungan Statin dalam Ekstrak Bekasam

Analisis kandungan statin ditujukan untuk mendukung data inhibisi ekstrak bekasam terhadap enzim HMG-KoA reduktase, karena statin merupakan inhibitor utama enzim HMG-KoA reduktase (Barrios-Gonzales & Miranda 2010). Analisis kandungan statin menunjukkan bahwa kandungan statin pada ekstrak bekasam berkisar antara 73 – 88 ppm (Gambar 15). Keberadaan statin pada bekasam menunjukkan adanya mikroorganisme yang memproduksi statin pada bekasam dan kandungan rata-rata statin tertinggi terdapat pada bekasam ikan seluang (B-3).



Gambar 15 Kandungan statin pada ekstrak bekasam. A-1 dan A-2 merupakan bekasam ikan gabus; B-1, B-2 dan B-3 merupakan bekasam ikan seluang.

Protein merupakan komponen nutrisi terbesar pada daging ikan. Protein berfungsi sebagai sumber nitrogen (N) bagi pertumbuhan mikroorganisme selama proses fermentasi ikan. Ikan gabus (*Chana striata*) dan ikan seluang (*Rasbora sp.*) sebagai bahan baku bekasam memiliki kandungan protein yang berbeda. Kandungan protein dalam ikan gabus sebesar 16.2% (Mustafa *et al.* 2012), sedangkan ikan seluang sebesar 17.75% (Lihartana & Harris 2013). Adanya perbedaan kandungan protein menyebabkan perbedaan komposisi asam amino dan hal ini berperan penting dalam biosintesis statin. Asam amino metionina merupakan asam amino paling berpengaruh pada biosintesis statin (Osman *et al.* 2011), sehingga kandungan metionina yang lebih tinggi pada ikan seluang menyebabkan rata-rata kandungan statin yang lebih tinggi serta daya inhibisi HMG-KoA reduktase juga lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak bekasam ikan gabus.

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Inhibitor Enzim HMG-KoA Reduktase Asal Bekasam

Bakteri Resisten terhadap Statin

Mikroorganisme penghasil statin harus bersifat resisten (tahan) terhadap statin, dimana mikroorganisme penghasil statin, mengandung gen penyandi resisten terhadap statin yaitu *mlcD* dan *mlcE* yang resisten terhadap compactin serta *orf8* dan *orf10* yang resisten terhadap lovastatin (Abe *et al.* 2002). Hasil isolasi mikroorganisme dari bekasam menunjukkan bahwa beberapa bakteri dari bekasam bersifat tahan terhadap compactin dan lovastatin. Bakteri yang tahan terhadap compactin maupun lovastatin mungkin mampu menghasilkan jenis statin tertentu. Chen *et al.* (2006) telah melakukan seleksi beberapa bakteri yang resisten terhadap compactin dan menyimpulkan bakteri *Streptomyces roseochromogenus*, *S. carbophilus*, *S. halstedii*, *Actinomadura sp.*, serta *Streptomyces sp* sebagai bakteri yang menghasilkan pravastatin. Selain itu, *Amycolatopsis sp.*, yang resisten terhadap lovastatin mampu menghasilkan jenis statin lainnya, yaitu *wuxistatin* (Zhuge *et al.* 2008). Kemampuan tumbuh dan berkembang beberapa bakteri yang tahan terhadap compactin ataupun lovastatin dapat diamati dengan melihat adanya peningkatan nilai *Optical Density* (OD) pada kultur yang ditumbuhkan dalam media MRSB dengan penambahan compactin/lovastatin (Tabel 4). Semakin besar nilai OD menunjukkan semakin banyak/padat jumlah bakteri pada media kultur serta mengindikasikan semakin tinggi pertumbuhan bakteri yang resisten terhadap compactin atau lovastatin.

Tabel 4 *Optical Density* (OD) kultur bakteri dari bekasam

| Kultur* | K | K | C | C | C | C | I | I | I | I |
|-----------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|---|
| (MRS) | ontrol | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| D_{620} | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | .087 | .334 | .269 | .378 | .262 | .391 | .348 | .412 | .386 | |

Ket: C : kultur bakteri dari bekasam dengan media penseleksi MRS + compactin

L : kultur bakteri dari bekasam dengan media penseleksi MRS + lovastatin

*Angka 1, 2, 3, 4 menunjukkan sampel bekasam no 1 - 4

*Kultur diinkubasi pada 35 °C selama 5 hari, OD pada λ 620 nm

Nilai *Optical Density* (OD) pada Tabel 4 menunjukkan adanya pertumbuhan mikroorganisme pada media kultur MRSB yang ditambah compactin ataupun lovastatin. Hal ini menunjukkan bahwa pada media kultur yang ditambah dengan ekstrak bekasam terdapat mikroorganisme yang tahan terhadap compactin maupun lovastatin yang dibuktikan dengan adanya peningkatan nilai OD bila dibandingkan dengan kontrol (media MRSB tanpa kultur). Walaupun secara statistik rata-rata nilai OD menunjukkan tidak berbeda nyata namun media kultur yang ditambah dengan compactin memiliki rata-rata nilai OD lebih rendah dibandingkan dengan media yang ditambah dengan lovastatin. Selain itu konsentrasi compactin yang digunakan untuk skrining dalam media MRSB lebih rendah yaitu 100 µg/mL (Chen *et al.* 2006) sedangkan lovastatin 1 mg/mL (Zhuge *et al.* 2008), sehingga dapat disimpulkan bahwa compactin lebih efektif dalam menyeleksi bakteri yang resisten terhadap statin dibandingkan lovastatin. Hal ini berhubungan dengan sifat compactin yang menghambat pertumbuhan sel, sehingga dalam sejarah penemuan statin, compactin tidak diperdagangkan sebagai obat, sedangkan lovastatin lebih dikenal sebagai antifungi (Barrios-Gonzales & Miranda 2010).

Kultur bakteri C3 dan L3 memiliki pertumbuhan terbaik dibandingkan dengan kultur yang lainnya dengan nilai OD tertinggi. Data ini menunjukkan bahwa kultur bakteri C3 dan L3 bersifat paling resisten terhadap statin (compactin maupun lovastatin). Kedua kultur bakteri tersebut berasal dari jenis bekasam yang sama yaitu bekasam yang terbuat dari ikan seluang. Kondisi ini menunjukkan bahwa jumlah bakteri yang resisten terhadap compactin/lovastatin lebih banyak terdapat pada bekasam ikan seluang dibandingkan dengan bekasam ikan gabus. Hal ini juga sejalan dengan jumlah statin pada bekasam ikan seluang yang lebih tinggi dibandingkan dengan ikan gabus (Gambar 15). Kultur C3 dan L3 dari bekasam ikan seluang digunakan untuk tahapan skrining/seleksi bakteri penghasil statin selanjutnya.

Tahapan seleksi untuk memperoleh bakteri penghasil statin pada media MRS agar (MRSA) dilakukan dengan menambahkan compactin dan lovastatin berturut turut 150 µg/mL dan 2 mg/mL. Pada tahapan ini diperoleh 20 isolat dengan karakteristik koloni yang berbeda-beda. Pengamatan lebih lanjut terhadap ke-20 koloni yang berbeda menunjukkan morfologi bakteri yang beragam seperti yang terlihat pada Tabel 5. Dari 20 koloni yang diisolasi, 13 koloni merupakan bakteri berbentuk kokus dan sisanya batang. Beberapa bakteri penghasil statin diketahui berbentuk batang berfilamen maupun kokus (Park *et al.* 2003).

Tabel 5 Morfologi bakteri yang resisten terhadap compactin maupun lovastatin

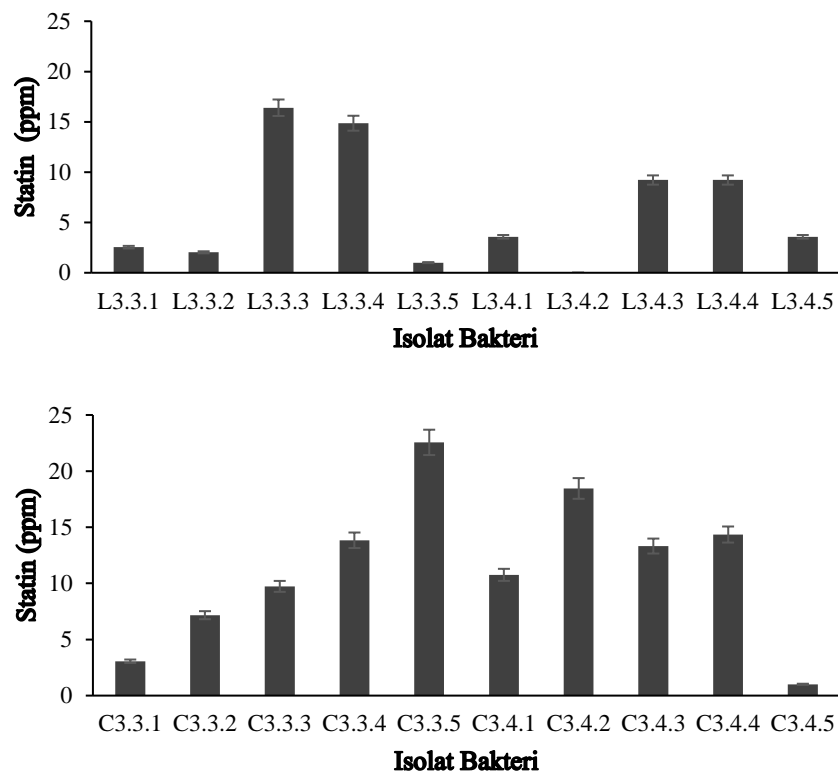
| No | N | Isolat | Bentuk Sel | No | Isolat | Bentuk |
|----|--------|--------------------|------------|--------|--------------------|--------|
| 1 | C3.4.1 | Kokus sel tunggal | 11 | L3.4.1 | Batang sel tunggal | |
| 2 | C3.4.2 | Batang sel tunggal | 12 | L3.4.2 | Batang sel tunggal | |
| 3 | C3.4.3 | Kokus bergerombol | 13 | L3.4.3 | Kokus sel tunggal | |
| 4 | C3.4.4 | Kokus rantai | 14 | L3.4.4 | Kokus sel tunggal | |

| | | | | | |
|----|-------------|-----------------------|----|-------|-----------------------|
| 5 | C3.4.5 | Kokus sel tunggal | 15 | L3.4. | Kokus sel tunggal |
| 6 | C.3.3. 1 | Kokus tetrat | 16 | L3.3. | Kokus sel tunggal |
| 7 | C3.3.2 | Kokus sel tunggal | 17 | L3.3. | Batang sel tunggal |
| 8 | C3.3.3 | Kokus sel tunggal | 18 | L3.3. | Batang sel tunggal |
| 9 | C3.3.4 | Kokus sel tunggal | 19 | L3.3. | Batang sel tunggal |
| 10 | C3.3.5 | Batang sel tunggal | 20 | L3.3. | Kokus sel tunggal |

Ket: Isolat berkode C menunjukkan bakteri resisten terhadap compactin; L menunjukkan bakteri resisten terhadap lovastatin.

Analisis Produksi Statin

Analisis terhadap kandungan statin (lovastatin dan compactin) dari ke-20 isolat yang resisten terhadap compactin dan lovastatin menunjukkan hasil yang beragam. Tidak semua isolat bakteri yang resisten terhadap compactin/lovastatin mampu memproduksi statin (compactin dan lovastatin), isolat L3.4.2 terbukti tidak menghasilkan statin. Kandungan statin yang diproduksi oleh isolat bakteri berkisar antara 0 – 22.6 ppm, dimana kandungan statin terbesar secara berturut-turut diproduksi oleh isolat bakteri C3.3.5; C3.4.2; L3.3.3; L3.3.4; dan C3.4.4 (Gambar 16). Faktor utama yang menyebabkan mikroorganisme mampu membentuk statin adalah adanya gen penyandi statin. Analisis terhadap gen penyandi produksi statin tidak dilakukan dalam penelitian ini. Faktor lain yang mempengaruhi produksi statin adalah kondisi kultur meliputi pH, surfaktan dan komposisi media (Barrios-Gonzales & Miranda 2010). *Aspergillus terreus* memproduksi lovastatin secara optimal pada inkubasi dengan suhu 30 °C, pH 8.5; glukosa sebagai sumber karbon, dan metionina sebagai sumber asam amino pembentuk lovastatin (Osman *et al.* 2011). *Penicillium brevicompactum* optimum memproduksi compactin pada kondisi inkubasi suhu 25 °C, penambahan gliserol 22% sebagai sumber karbon, dan pH 6.5 (Shaligram *et al.* 2009). Skrining/seleksi terhadap bakteri penghasil pravastatin lebih optimum dilakukan pada media basal dengan manitol 7% sebagai sumber karbon, pH 7.2 dan suhu inkubasi 28 °C (Chen *et al.* 2006).



Gambar 16 Kandungan statin dari isolat bakteri asal bekasam yang diseleksi menggunakan lovastatin (A) dan compactin (B). Analisis statin menggunakan spektrofotometer pada λ 238 nm.

Kandungan statin maksimum yang diproduksi oleh isolat bakteri sebesar 22.6 ppm, nilai tersebut lebih rendah bila dibandingkan dengan kandungan statin pada bekasam sebesar 88 ppm, hal ini disebabkan oleh keberadaan mikroorganisme pada bekasam yang sangat kompleks sehingga terdapat mikroorganisme lain yang mungkin membentuk statin pada bekasam. Semakin banyak mikroorganisme pada bekasam yang mampu membentuk statin menyebabkan semakin tinggi kandungan statin pada bekasam, selain itu produksi statin oleh bakteri selama proses fermentasi juga terakumulasi dalam bekasam.

Data analisis statin menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 238 nm menunjukkan bahwa besarnya kadar lovastatin dan compactin pada setiap kultur bakteri hampir sama. Hal ini menunjukkan bahwa lovastatin dan compactin dapat terdeteksi secara baik oleh spektrofotometer pada panjang gelombang yang sama (238 nm). Oleh karena itu dilakukan analisis statin menggunakan HPLC untuk lebih mengetahui keberadaan statin yang sebenarnya, yaitu lovastatin ataupun compactin. Hasil analisis statin menggunakan HPLC dari 5 isolat yang potensial menghasilkan statin dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6 Hasil analisis statin menggunakan HPLC dari 5 isolat bakteri yang potensial memproduksi statin

| Lovastatin | Compactin |
|------------|-----------|
|------------|-----------|

| Isolat Bakteri | Waktu Retensi Standar | Waktu Retensi Sampel | Konsentrasi Lovastatin (ppm) | Waktu Retensi Standar | Waktu Retensi Sampel | Konsentrasi Compactin (ppm) |
|----------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------|
| C3.3.5 | 4.23 | 4.18 | 0.07 | 1.51 | ND | 0 |
| C3.4.2 | 4.23 | 4.30 | 1.54 | 1.51 | ND | 0 |
| L3.3.3 | 4.23 | 4.30 | 0.04 | 1.51 | ND | 0 |
| | 4.23 | 4.31 | | | ND | |
| L3.3.4* | | | 9.49* | 1.51 | | 0 |
| C3.4.4 | 4.23 | - | 0.00 | 1.51 | ND | 0 |

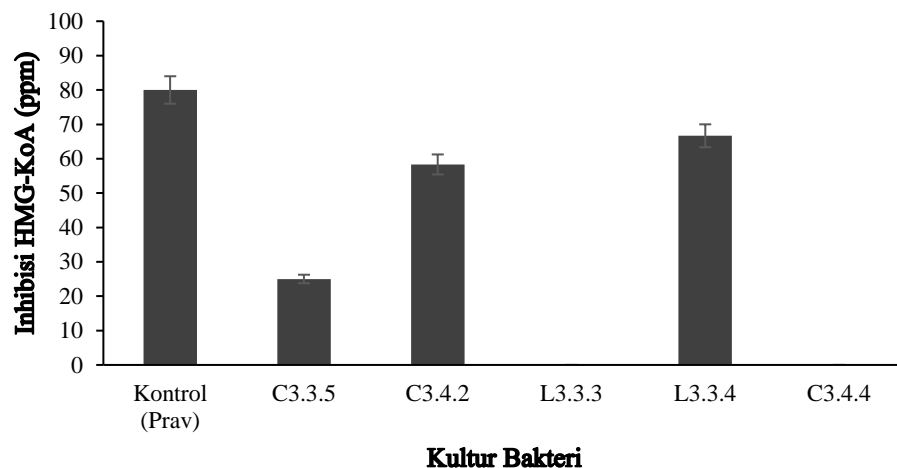
Ket: * L3.3.4 merupakan isolat bakteri dengan kandungan lovastatin tertinggi

ND: Tidak terdeteksi

Pada Tabel 6 dapat dilihat bahwa lovastatin dapat terdeteksi pada semua isolat kecuali C3.4.4, namun compactin tidak dapat terdeteksi pada panjang gelombang 238 nm. Hal ini menunjukkan bahwa jenis statin yang diproduksi oleh isolat bakteri dari bekasam adalah lovastatin. L3.3.4 merupakan isolat yang memproduksi lovastatin tertinggi sebesar 9.49 ppm, namun kandungan lovastatin yang diproduksi oleh isolat dari bekasam jauh lebih kecil bila dibandingkan produksi statin dari kapang yang berasal dari angkak merah (Danuri 2008). Osman *et al.* 2011 menyatakan bahwa produksi lovastatin dari *Aspergillus terreus* pada awalnya adalah 54.5 ppm namun setelah dilakukan optimasi, produksi lovastatin meningkat menjadi 188.30 ppm. Oleh karena itu diperlukan optimasi dengan berbagai perlakuan untuk meningkatkan produksi lovastatin. Meskipun demikian isolat bakteri penghasil statin dari bekasam dapat digunakan lebih lanjut untuk meningkatkan kandungan statin dari bekasam sehingga bekasam dapat dikembangkan sebagai pangan fungsional untuk menurunkan kolesterol darah.

Penghambatan Metabolit Bakteri terhadap Enzim HMG-KoA Reduktase

Analisis terhadap kemampuan inhibisi hasil metabolit bakteri dari bekasam menunjukkan bahwa tiga (3) isolat bakteri mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Isolat L3.3.4 merupakan bakteri dengan kemampuan terbesar dalam menghambat enzim HMG-KoA reduktase sebesar 66.67%, diikuti oleh isolat bakteri C3.4.2 (58.33%) dan C3.3.5 (25.00%), sedangkan isolat L3.3.3 dan C3.4.4 tidak menunjukkan adanya penghambatan (Gambar 17). Daya inhibisi isolat bakteri sejalan dengan kandungan lovastatin yang ada. Kandungan lovastatin pada L3.3.4 sebesar 9.491 ppm, konsentrasi ini merupakan kandungan lovastatin tertinggi bila dibandingkan dengan kandungan lovastatin dari bakteri lainnya, diikuti oleh isolat bakteri C3.4.2 sebesar 1.536 ppm.



Gambar 17 Daya inhibisi isolat bakteri dari bekasam terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Pravastatin sebagai kontrol, diukur menggunakan spektrofotometer λ 340 nm.

Daya hambat isolat bakteri dari bekasam masih lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (pravastatin). Hal ini disebabkan karena pravastatin yang digunakan merupakan pravastatin komersil (Sigma Aldrich) yang murni. Meskipun demikian, terdapat 2 isolat bakteri yang memiliki daya hambat diatas 50% yaitu isolat L3.3.4 dan C3.4.2. Kecilnya kandungan statin dari isolat bakteri (< 10 ppm) tidak sebanding dengan besarnya daya hambat yang dimiliki oleh isolat L3.3.4 dan C3.4.2, sehingga dimungkinkan adanya komponen bioaktif lain yang mendukung aktivitas penghambatan lovastatin terhadap enzim HMG-KoA reduktase. Selain statin, peptida juga terbukti menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase, meskipun daya hambatnya kurang dari 50% (Kato *et al.* 2009). Oleh karena itu kajian peptida sebagai inhibitor enzim HMG-KoA reduktase juga dilakukan dalam penelitian ini.

Morfologi dan Identifikasi Bakteri Penghasil Lovastatin

Uji terhadap morfologi isolat bakteri penghasil inhibitor HMG-KoA reduktase menunjukkan bahwa isolat L3.3.4 dan C3.4.2 merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang tidak berspora, katalase negatif, tidak motil dan tumbuh optimum pada suhu 30-37 °C. Hasil fermentasi gula menggunakan API CH 50 dan CHL mengindikasikan bahwa isolat L3.3.4 adalah *Lactobacillus acidophilus* dengan nilai kesamaan ciri (*identity*) sebesar 99%, sedangkan isolat C3.4.2 merupakan *Lactobacillus delbruckii sp. delbruckii* (89.7%). Kedua bakteri termasuk dalam golongan bakteri asam laktat yang merupakan golongan bakteri yang mendominasi pada produk-produk fermentasi ikan seperti bekasam (Desniar 2012).

Sampai saat ini produksi statin oleh bakteri asam laktat (BAL) belum pernah dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Selama ini statin dihasilkan oleh beberapa kapang seperti *Aspergillus terreus*, *Penicillium brevicompactum* dan bakteri yaitu *Streptomyces roseochromogenus*, *S. carbophilus*, *S. halstedii*, *Actinomadura sp.*, *Streptomyces sp.*, serta *Bacillus megaterium* (Barrios-Gonzales & Miranda 2010).

Lactobacillus acidophilus menghasilkan komponen metabolit yang mempunyai daya inhibisi HMG-KoA reduktase lebih besar dibandingkan dengan *Lactobacillus delbrueckii sp. delbrueckii*, oleh karena itu dilakukan optimasi fermentasi terhadap *Lactobacillus acidophilus* untuk menghasilkan daya inhibisi maksimum terhadap HMG-KoA reduktase.

Produksi Inhibitor HMG-KoA Reduktase oleh *Lactobacillus acidophilus*

Pengaruh Suhu Inkubasi terhadap Produksi Lovastatin dan Inhibisi HMG-KoA Reduktase dari *Lactobacillus acidophilus*

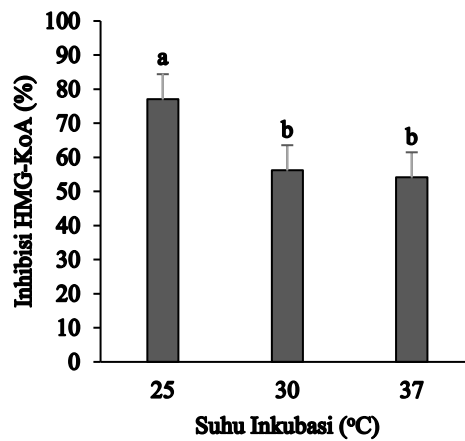
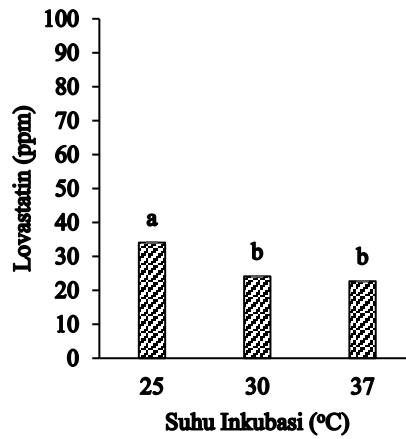
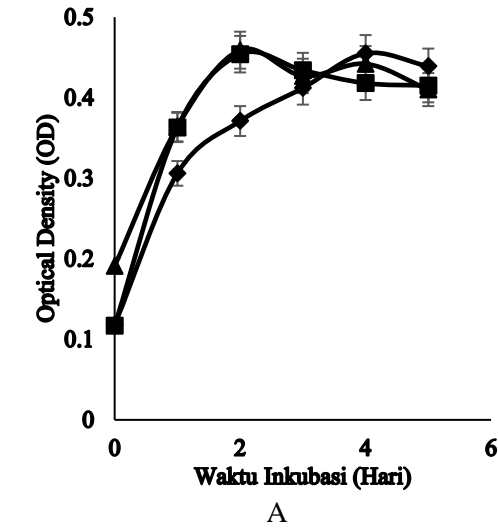
Fermentasi *Lactobacillus acidophilus* dilakukan pada berbagai variasi suhu dari 25 – 37 °C, untuk mempelajari pengaruhnya pada biosintesis lovastatin dan inhibisi HMG-KoA reduktase. Hasil penelitian pada Gambar 18A menunjukkan bahwa laju pertumbuhan *L. acidophilus* terhambat pada suhu 25 °C dan tumbuh cepat pada suhu 30-37 °C. Fase log pertumbuhan pada suhu 30-37 °C berakhir pada hari ke-2, sedangkan fase log pada suhu inkubasi 25 °C berakhir pada hari ke-4. Meskipun demikian, titik maksimum fase log pada suhu 25, 30 dan 37 °C tidak berbeda yaitu pada kisaran nilai optikal densiti (OD) 0.45.

Fase stasioner pada suhu inkubasi 30 dan 37 °C lebih cepat tercapai, karena pertumbuhan yang cepat pada fase logaritmik menyebabkan semakin cepat berkurangnya nutrisi pada media pertumbuhan. Selain itu, pertumbuhan yang cepat menyebabkan semakin cepatnya akumulasi produk metabolit *L. acidophilus*. Dalam beberapa kasus, akumulasi produk metabolit justru menyebabkan inhibisi terhadap pertumbuhan bakteri produser.

Lactobacillus acidophilus merupakan bakteri mesofilik yang tumbuh pada suhu 20 sampai 40 °C dan tumbuh optimum pada suhu 30-37 °C. Bakteri ini banyak terdapat pada produk makanan yang difermentasi secara spontan pada suhu 30-37 °C (Desniar *et al.* 2012 dan Rhee *et al.* 2011), serta mampu tumbuh dalam saluran pencernaan manusia sehingga pertumbuhan optimumnya sesuai dengan kisaran suhu tubuh manusia (Mohania *et al.* 2013). *L. acidophilus* merupakan bakteri homofermentatif yang menghasilkan asam laktat. Pertumbuhan maksimum *L. acidophilus* selama fase logaritmik dapat meningkatkan produksi metabolit primer (asam laktat) namun mengurangi nutrisi dalam media kultur. Akumulasi asam laktat dan berkurangnya nutrisi di dalam media kultur bakteri dapat menghambat pertumbuhan *L. acidophilus* itu sendiri.

Produksi lovastatin tertinggi dari *L. acidophilus* terjadi pada suhu inkubasi 25 °C yaitu sebesar 34.07 ppm (Gambar 18B). Uji ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan suhu 25 °C menghasilkan perbedaan yang nyata produksi lovastatin dengan suhu 30 dan 37 °C sedangkan suhu 30 dan 37 tidak berbeda nyata. Lovastatin merupakan produk metabolit sekunder yang diproduksi ketika mikroorganisme tidak tumbuh dengan baik. Salah satu fungsi lovastatin bagi mikroorganisme produser adalah sebagai agen antagonis terhadap mikroorganisme lainnya. Terhambatnya pertumbuhan *L. acidophilus* pada suhu 25 °C menyebabkan pembentukan lovastatin lebih tinggi dibandingkan suhu inkubasi lainnya. Kisaran suhu produksi statin berbeda-beda di antara jenis mikroorganisme, seperti *Aspergillus terreus* memproduksi lovastatin optimum pada suhu 30 °C (Javed *et al.* 2010) dan pada suhu 25 °C (Jahromi *et al.* 2012), *Aspergillus niger* memproduksi

lovastatin optimum pada suhu 28 °C (Ragunath *et al.* 2012) dan 25°C (Rashid *et al.* 2013).



B

C

Gambar 18 Pengaruh suhu inkubasi terhadap pertumbuhan *L. acidophilus* (A), produksi lovastatin (B) dan daya inhibisi HMG-KoA reduktase (C). Suhu inkubasi 25 °C (-♦-); suhu inkubasi 30 °C (-■-); dan suhu inkubasi 37 °C (-▲-)

Pada beberapa mikroorganisme, produksi lovastatin tertinggi terdapat pada waktu inkubasi 4 – 10 hari (Osman *et al.* 2011). Jumlah sel *L. acidophilus* yang tumbuh pada perlakuan suhu 30 dan 37 °C pada periode waktu inkubasi 4 hari lebih rendah dibandingkan dengan sel pada suhu 25 °C (Gambar 18A), hal ini yang menyebabkan produksi lovastatin pada suhu 25 °C lebih tinggi dibandingkan dengan suhu lainnya. Meskipun demikian diperlukan kajian lebih lanjut untuk mengetahui waktu inkubasi yang optimum bagi *L. acidophilus* dalam menghasilkan lovastatin.

Suhu optimum untuk memproduksi lovastatin berbeda pada beberapa mikroorganisme. Produktivitas lovastatin maksimum dari *L. acidophilus* pada penelitian ini terjadi pada suhu 25 °C, kondisi ini sama dengan produksi lovastatin pada *Aspergillus terreus* (Jahromi *et al.* 2012) dan *Aspergillus niger* (Rashid *et al.* 2013). Di sisi lain, Javed *et al.* (2010) melaporkan biosintesis optimum lovastatin dari *A. Terreus* terjadi pada suhu 30 °C dan *A. Niger* terjadi pada suhu 28 °C (Ragunath *et al.* 2012).

Kandungan lovastatin pada hasil metabolit *L. acidophilus* mempengaruhi daya inhibisi aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Kandungan lovastatin yang lebih tinggi pada suhu inkubasi 25 °C (34.07 ppm), menyebabkan daya inhibisi hasil metabolit *L. acidophilus* pada suhu tersebut lebih tinggi (77.08%) dibandingkan suhu inkubasi 30 dan 37 °C (berturut turut 56.25% dan 54.17%). Uji ANOVA menunjukkan bahwa daya inhibisi metabolit *L. acidophilus* pada suhu inkubasi 25 °C berbeda nyata dengan inhibisi pada 30 dan 37 °C. Kondisi ini menunjukkan bahwa kandungan lovastatin pada metabolit *L. acidophilus* menjadi penentu daya inhibisi metabolit *L. acidophilus* terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase.

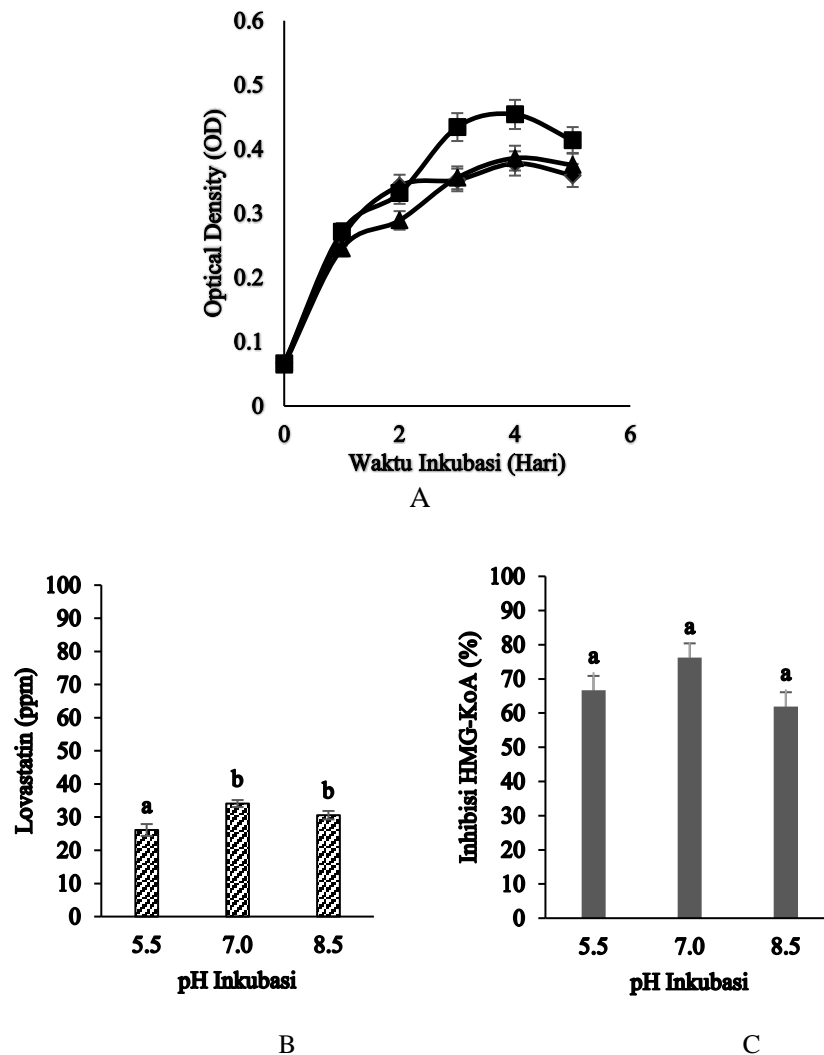
Bila dibandingkan dengan produksi lovastatin pada angkak merah, kandungan lovastatin dari *L. acidophilus* lebih kecil (50%) namun memiliki daya inhibisi tinggi (> 70%). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh komponen bioaktif lain yang dihasilkan oleh *L. acidophilus*, bakteri ini diketahui termasuk golongan bakteri asam laktat yang juga menghasilkan peptida berupa bakteriosin yaitu acidofilin, acidocin, maupun lactacin dengan kisaran berat molekul 6.2–9.5 kD. Bakteriosin selama ini diketahui sebagai antimikroorganisme lain yang dihasilkan oleh beberapa bakteri asam laktat (Yamato *et al.* 2003). Hubungan antagonis maupun sinergisme antara bakteriosin/peptida dan lovastatin selama ini belum dipelajari.

Pengaruh pH terhadap Produksi Lovastatin dan Inhibisi HMG-KoA Reduktase dari *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus yang diisolasi dari bekasam tumbuh dengan optimum pada pH 7.0 namun terhambat pada pH media 5.5 dan 8.5. Pada awal fase stasioner, jumlah bakteri yang tumbuh pada pH 7 jauh di atas jumlah bakteri pada pH 5.5 dan 8.5 (Gambar 19A).

L. acidophilus merupakan bakteri yang menghasilkan asam laktat. Akumulasi asam laktat dalam media kultur dapat menurunkan pH media sampai dengan pH 4. Meskipun bakteri *Lactobacillus* dapat tumbuh dengan baik pada pH 4 namun pertumbuhan optimum bakteri berlangsung pada pH 6 – 8 (Desniar *et al.*

2012). Pada pH 6-8, pertumbuhan bakteri asam laktat lebih optimal karena terhindar dari *acidity shock*.



Gambar 19 Pengaruh pH media inkubasi terhadap pertumbuhan *L. acidophilus* (A), produksi lovastatin (B) dan inhibisi HMG-KoA reduktase (C). pH 5.5 (-◆-) pH 7.0 (-■-) pH 8.5 (-▲-)

Pertumbuhan optimum *L. acidophilus* pada pH 7.0 (Gambar 19A) diikuti oleh produksi lovastatin yang optimum (Gambar 19B). Kondisi ini lebih disebabkan oleh titik maksimum pertumbuhan *L. acidophilus* pada pH 7.0 lebih tinggi sehingga jumlah bakteri yang hidup pada awal fase stasioner lebih banyak dibandingkan pada pH 5.5 dan pH 8.5. Semakin banyak jumlah sel bakteri pada saat kondisi stasioner menyebabkan semakin tinggi produksi lovastatin yang merupakan produk metabolit sekunder. Meskipun demikian, uji ANOVA menunjukkan bahwa perlakuan pH 7.0 dan 8.5 mempunyai kandungan lovastatin yang tidak berbeda nyata sedangkan pada pH 5.5 berbeda nyata dengan yang lainnya. Kondisi ini disebabkan karena stabilitas lovastatin menurun pada pH asam (5.5) yang disebabkan oleh kerusakan pada struktur lovastatin. Lovastatin mempunyai kerangka utama poliketida, yaitu suatu cincin hidroksiheksahidronaptalen pada

rantai sisi C6 dan C8 terikat dengan metilbutirat dan hidroksilakton. Kerusakan disebabkan oleh terlepasnya gugus yang menyusun kerangka poliketida berupa cincin hidroksiheksahidronaptalen, juga dimungkinkan terjadi kerusakan ikatan rangkap pada struktur tersebut atau terbukanya ikatan rangkap. Pada kondisi alkali lovastatin lebih stabil dibandingkan pH asam dan paling stabil pada pH netral (Tedjautama & Zubaedah 2014). Beberapa mikroorganisme memiliki perbedaan pH optimum dalam memproduksi statin, *Aspergillus terreus* memproduksi statin optimum pada pH yang berbeda-beda, yaitu pada pH 6 (Javed *et al.* 2010 dan Jahromi *et al.* 2012) serta pH 8.5 (Osman *et al.* 2011). *Aspergillus niger* memproduksi lovastatin optimum pada pH 6-6.5 (Ragunath *et al.* 2012 dan Rashid *et al.* 2013), sedangkan *Penicillium citrinum* memproduksi statin optimum pada pH 6-7 (Chakravarti & Sahai 2004).

Kandungan lovastatin yang tinggi pada inkubasi *L. acidophilus* pH 7.0 berkorelasi positif dengan daya inhibisi HMG-KoA reduktase. Daya inhibisi hasil metabolit *L. acidophilus* pada pH 7.0 lebih tinggi dibandingkan dengan pH lainnya (Gambar 19C). Meskipun demikian, uji ANOVA menunjukkan bahwa hasil inhibisi metabolit *L. acidophilus* pada pH 5.5, 7.0 dan 8.5 menunjukkan tidak berbeda nyata. Daya inhibisi yang tidak berbeda nyata dapat disebabkan oleh adanya komponen bioaktif lain yang mempengaruhi aktivitas HMG-KoA reduktase. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri asam laktat homofermentatif yang juga menghasilkan peptida. Meskipun belum ada penelitian yang menyebutkan bahwa peptida dari *L. acidophilus* mempengaruhi aktivitas HMG-KoA reduktase, namun fraksinasi terhadap metabolit *L. acidophilus* menghasilkan peptida dengan berat molekul 6.3 kD yang mempunyai daya inhibisi terhadap HMG-KoA reduktase (Gambar 21 dan 22). Selain itu pH asam mempengaruhi stabilitas lovastatin. Kultur *L. acidophilus* yang diinkubasi pada pH media 5.5, 7.0, dan 8.5 menghasilkan metabolit dengan kondisi asam (berturut-turut 3.99, 4.31, dan 4.2). Kondisi kultur yang asam menyebabkan daya inhibisi lovastatin terhadap HMG-KoA reduktase tidak berbeda nyata.

Pada penelitian ini, penambahan gliserol dalam media MRSB juga dilakukan, namun tidak menunjukkan hasil yang baik dalam produksi lovastatin dan inhibisi metabolit ekstraseluler *L. acidophilus* terhadap HMG-KoA reduktase. Kesimpulan sementara dari tahapan penelitian ini adalah bahwa *L. acidophilus* menghasilkan lovastatin dan daya inhibisi HMG-KoA reduktase tertinggi pada suhu inkubasi 25 °C dan pH 7.0.

Bila produktivitas lovastatin dari *L. acidophilus* dibandingkan dengan produktivitas lovastatin dari angkak merah, maka kandungan lovastatin pada angkak merah lebih tinggi. Meskipun demikian, ekstrak hasil metabolit *L. acidophilus* memiliki daya inhibisi tinggi terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase (> 70%) seperti halnya angkak. Hal ini mengindikasikan keberadaan komponen bioaktif lain yang dihasilkan *L. acidophilus* yang juga mampu menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase. Oleh karena itu dalam tahapan penelitian selanjutnya dikaji komponen bioaktif lain selain lovastatin yang diduga mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase.

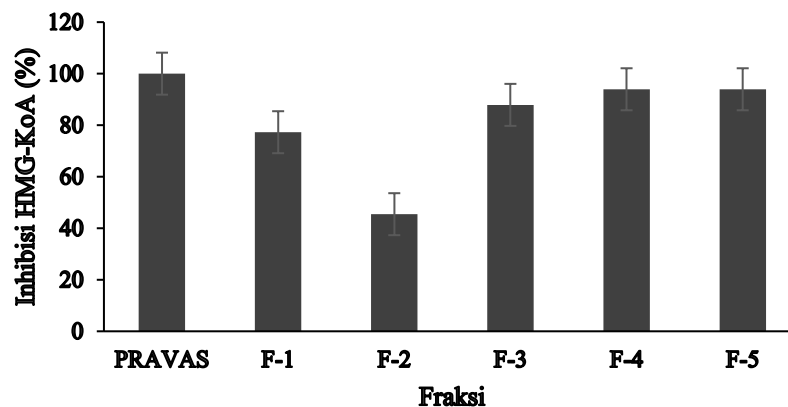
Kandungan Lovastatin Hasil Fermentasi *L. acidophilus*

Produksi lovastatin dilakukan pada media MRSB dengan kondisi inkubasi pada suhu 25 °C dan pH 7.0. Hasil produksi lovastatin yang dianalisis menggunakan HPLC menunjukkan bahwa lovastatin terdeteksi pada waktu retensi 2.917 menit dengan kosentrasi 62.90 ppm, lovastatin yang digunakan sebagai standar dari Sigma-Aldrich, USA. Komponen metabolit yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* sangat beragam bila dilihat pada panjang gelombang 237 nm. Hal ini menunjukkan adanya metabolit lain yang juga mempengaruhi kinerja lovastatin dalam menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase. Oleh karena itu dilakukan fraksinasi terhadap metabolit *L. acidophilus* berdasarkan berat molekul dan menguji daya inhibisi masing-masing fraksi terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase.

Identifikasi Lanjut Komponen Bioaktif Inhibitor Enzim HMG-KoA Reduktase Dari *Lactobacillus acidophilus*

Fraksinasi dan Inhibisi Fraksi Metabolit *L. acidophilus* terhadap Enzim HMG-KoA Reduktase

Fraksinasi berdasarkan berat molekul terhadap hasil metabolit *L. acidophilus* menghasilkan 4 fraksi yaitu fraksi utuh yang merupakan metabolit *L. acidophilus* (F1), fraksi metabolit dengan berat molekul > 10 kD (F2), fraksi metabolit dengan berat molekul antara 3 – 10 kD (F4) serta fraksi metabolit dengan berat molekul < 3 kD. Keempat fraksi tersebut memiliki daya inhibisi yang berbeda-beda. Fraksi 4 dan 5 (BM < 3 kD) memiliki daya inhibisi tertinggi, disusul fraksi 3 (BM antara 3 – 10 kD), fraksi 1 (ekstrak utuh), dan fraksi 2 (BM > 10 kD) (Gambar 20). Besarnya daya inhibisi pada fraksi 4 disebabkan oleh keberadaan lovastatin, dan pada fraksi 4 tidak terdeteksi adanya peptida. *L. acidophylus* tidak menghasilkan peptida dengan BM < 3 kD (Gambar 21).

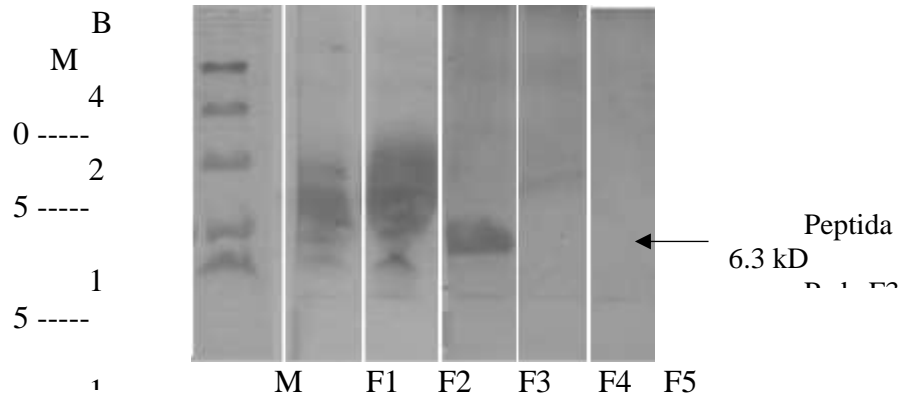


Gambar 20 Daya inhibisi fraksi metabolit *L. acidophilus* terhadap enzim HMG-KoA reduktase. Pravastatin sebagai kontrol (Pravas), Fraksi ekstrak utuh (F1), Fraksi BM > 10 kD (F2), Fraksi BM 3-10 kD (F3), Fraksi BM < 3 kD (F4), dan Fraksi BM < 1 kD (F5)

Profil Peptida Fraksi Metabolit *L. acidophilus*

Tujuan mengetahui keberadaan peptida pada fraksi metabolit *L. acidophilus* adalah untuk melihat peptida yang memiliki daya inhibisi terhadap HMG-KoA

reduktase dan melihat keberadaan peptida pada fraksi dengan daya inhibisi tertinggi (fraksi 4 dan 5). Pada Gambar 20 dan 21 menunjukkan bahwa pada fraksi 4 dan 5 yang memiliki daya inhibisi HMG-Koa reduktase tertinggi (93.94%) tidak terdeteksi adanya peptida. Hal ini menunjukkan bahwa daya inhibisi yang besar pada F4 dan F5 disebabkan oleh keberadaan lovastatin.

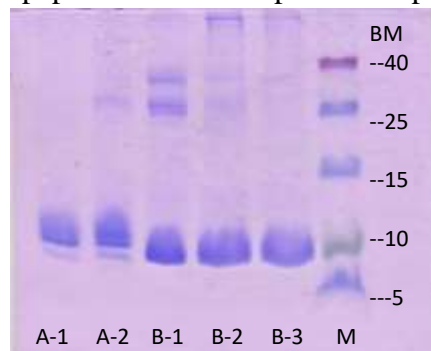


Gambar 21 Profil peptida fraksi metabolit *L. acidophilus*. Marker (M); Fraksi ekstrak utuh (F1), Fraksi BM>10 kD (F2), Fraksi BM 3-10 kD (F3), Fraksi BM< 3 kD (F4), dan Fraksi BM< 1 kD (F5)

Gambar 21 menunjukkan keberadaan peptida tunggal dengan berat molekul 6.3 kD pada fraksi F3, sedangkan pada fraksi F1 dan F2 terlihat lebih dari 1 peptida. Selama ini peptida yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* dengan berat molekul 6 - 9 kD diketahui sebagai golongan bakteriosin (Yamato *et al.* 2003). Oleh karena itu dilakukan sekuensing terhadap peptida 6.3 kD untuk menentukan apakah termasuk ke dalam golongan bakteriosin atau merupakan peptida lain yang dihasilkan oleh *Lactobacillus acidophilus*.

Profil Peptida Ekstrak Bekasam

Beberapa peptida diketahui memiliki sifat fungsional sebagai inhibitor HMG-Koa reduktase. Itou & Akahene (2009 dan 2010) menyatakan bahwa fraksi peptida dari ekstrak *narezushi* dan *heshiko* dapat menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase sebesar 36.97% . Sama halnya dengan *narezushi* dan *heshiko*, ekstrak bekasam juga mampu menghambat aktivitas enzim HMG-Koa reduktase. Oleh karena itu dilakukan pengamatan terhadap profil peptida ekstrak bekasam. Hasil pengamatan profil peptida bekasam dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22 Profil peptida ekstrak bekasam. Marker (M), bekasam ikan gabus (A1 dan A2), bekasam ikan seluang (B1, B2, dan B3)

Pada Gambar 22 dapat dilihat bahwa ekstrak bekasam mengandung peptida dengan kisaran berat molekul 5 – 40 kD. Bekasam dari ikan gabus (A-1 dan A-2) mengandung 2 jenis peptida yang serupa yaitu peptida dengan berat molekul (BM) 6.3 kD dan 7.4 kD serta pada A-2 terdapat 1 lagi jenis peptida BM 28.6 kD. Kedua jenis bekasam yang berasal dari ikan gabus ini memiliki kandungan peptida tertinggi pada BM 7.4 kD.

Pada bekasam ikan seluang (B-1, B-2, dan B-3) memiliki kesamaan jenis peptida dengan berat molekul 6.3 kD dan ini merupakan satu-satunya peptida yang terdeteksi pada B-3, sedangkan pada B-2 terdapat juga peptida dengan BM 28.6 dan pada B1 juga terdeteksi peptida dengan BM 28.6 dan 35.8

Satu pita peptida pada fraksi *L. acidophilus* 3-10 kD mempunyai kesamaan dengan pita peptida dari ekstrak bekasam yaitu dengan berat molekul 6.3 kD. Penemuan ini menunjukkan bahwa peptida yang dihasilkan oleh *L. acidophilus* banyak terdapat dalam bekasam. *Lactobacillus acidophilus* memproduksi peptida 6.3 kD selama proses fermentasi bekasam dan peptida ini berperan penting dalam inhibisi ekstrak bekasam terhadap enzim HMG-KoA reduktase.

Peptida Inhibitor HMG-KoA Reduktase

Pada tahapan penelitian ini, dilakukan sekuensing terhadap peptida yang memiliki daya inhibisi tinggi terhadap HMG-KoA reduktase. *L. acidophilus* biasanya memproduksi peptida dalam bentuk bakteriosin seperti *lactacin* dan *acidocin* serta beberapa *uncharacterized protein* lainnya yang memiliki berat molekul pada kisaran 4.2 sampai 6.6 kD (Yamato *et al.* 2003). Perbandingan hasil sekuensing terhadap peptida 6.3 kD yang memiliki daya inhibisi HMG-KoA reduktase dengan beberapa peptida dari bakteri asam laktat lainnya terlihat pada Tabel 7.

Tabel 7 Perbandingan susunan asam amino peptida 6.3 kD dengan peptida dari bakteri asam laktat lainnya

| Peptida | Skuen Asam Amino | Fungsi | Pustaka |
|--|--|--------------------------|---------------------------------|
| n <i>L. acidophilus</i> Acidocin | TAGGGxDTGEAEPGGSGQE AANGSGSLAPVGPVHTGANR | Anti bakteri | Deraz <i>et al.</i> 2007 |
| <i>L. plantarum</i> Plantari | KKKKQSWAAAGDAIVSFGG GFLN | Anti bakteri | Jimenez-Diaz <i>et al.</i> 1995 |
| <i>L. lactis</i> Nisin | MSTKDENLDLVSVSKKDSG ASPRI | Anti bakteri | Vandem eer <i>et al.</i> 1994 |
| Hypothetical Protein | MRKGENYNTG.....RNAKKR VAHV AAVVAFLNKA AKDENK | Resisten terhadap empedu | Pfeiler <i>et al.</i> 2007 |

| | | | |
|-------------------------|---|--|--|
| <i>L. acidophilus</i> | | | |
| Phospho carrier Protein | ...SDINLEYNGK..MSLGVGQ GADVTITADGDDAKEAIEAIADTK K EGLAE | Regulasi sistem fosfotransferase | www.ncbi.nlm.nih.gov |
| 6.3 | Peptide <i>L.</i> AAEVVA AFLNK EAIEAIADTMKK | Inhibitor HMG-KoA Reduktase | Hasil Penelitian ini |

Penelitian ini menunjukkan bahwa peptida yang berada pada fraksi 3 (F3) dengan berat molekul 6.3 kD mempunyai susunan asam amino KGENYNTGVTPNLRPKAAEVVAFLNKEAIEAIADTMKK dan merupakan inhibitor enzim HMG-KoA reduktase. Komposisi asam amino dalam peptida 6.3 kD didominasi oleh asam amino hidrofilik (55%). Analisis homologi antara peptida 6.3 kD dengan peptida bioaktif lain yang dihasilkan oleh *Lactobacillus sp.* menghasilkan beberapa kesamaan diantaranya dengan *hypothetical protein* pada *L. acidophilus* NCFM, yaitu 16 deretan asam amino dengan homologi 81% dan 9 deretan asam amino dengan homologi 89% (Pfeiler *et al.* 2007) sedangkan dengan *phosphocarrier protein* dari *L. acidophilus* terdapat 10 deretan asam amino dengan homologi 73% (www.ncbi.nlm.nih.gov). Secara keseluruhan peptida 6.3 kD pada hasil penelitian ini mempunyai homologi 60% dengan *hypothetical protein* dan 8.5% dengan *phosphocarrier protein* pada bakteri *L. acidophilus* lainnya. *Hypothetical protein* pada *L. acidophilus* NCFM berfungsi sebagai peptida anti asam empedu yang menyebabkan *L. acidophilus* NCFM tahan terhadap asam empedu. Penelitian ini menunjukkan penemuan baru peptida dari *Lactobacillus acidophilus* yang mempunyai aktivitas inhibisi enzim HMG-KoA reduktase.

Pada Tabel 7 terlihat bahwa peptida 6.3 kD dari hasil penelitian ini menunjukkan kedekatan homologi dengan *hypothetical protein/uncharacterized protein* pada bakteri *Lactobacillus*. Penelusuran lebih lanjut terhadap homologi peptida 6.3 kD dari *L. acidophilus* asal bekasam dengan beberapa *uncharacterized protein* dari bakteri *Lactobacillus* lainnya menggunakan *Standard Protein Blast* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) dan *Multiple Sequence Alignment* (www.ebi.ac.uk) menunjukkan bahwa peptida 6.3 kD merupakan peptida yang belum terkarakterisasi dan teridentifikasi fungsinya. Hasil *multiple alignment* menggunakan program *Multiple Sequence Alignment* (www.ebi.ac.uk) adalah sebagai berikut:

| | | |
|---|---|-----|
| <i>L. acidophilus</i> (penelitian ini) | KGENYNTGVTPNLRPK----- AAEVVAFLNKEAIEAIADTMKK | |
| <i>L. gasseri</i> ATCC 33323 (hypothetical protein) | ----- KGENYNTGVTPNLRPKNKKNSKARVKRAAEVVAFLNKAA----- | 69% |
| <i>L. hominis</i> DSM 23910 (uncharacterize protein) | ----- KGENYNTGVTPNLRPKNKRNSKARVKRAAEVVAFLNQAA----- | 67% |
| <i>L. amylolyticus</i> DSM 11664 (hypothetical protein) | ----- KGENYNTGCEPNQRPKNKRNAKRRVAHVAAVVSFLNKAA----- | 54% |

| | | |
|---|--|------------|
| <p><i>Lactobacillus</i> sp. ASF360 (hypothetical protein)</p> | <p> KGENYNTGCEPNQRPKNKRNAAKRVAVHVAAVVEFLNKAA-----</p> | <p>54%</p> |
| <p><i>L. acetotolerans</i> (hypothetical protein)</p> | <p> -GENY-TGCQPNHRPKNKKNGKKRVAVHVAAVVVSFLNK-----</p> | <p>53%</p> |

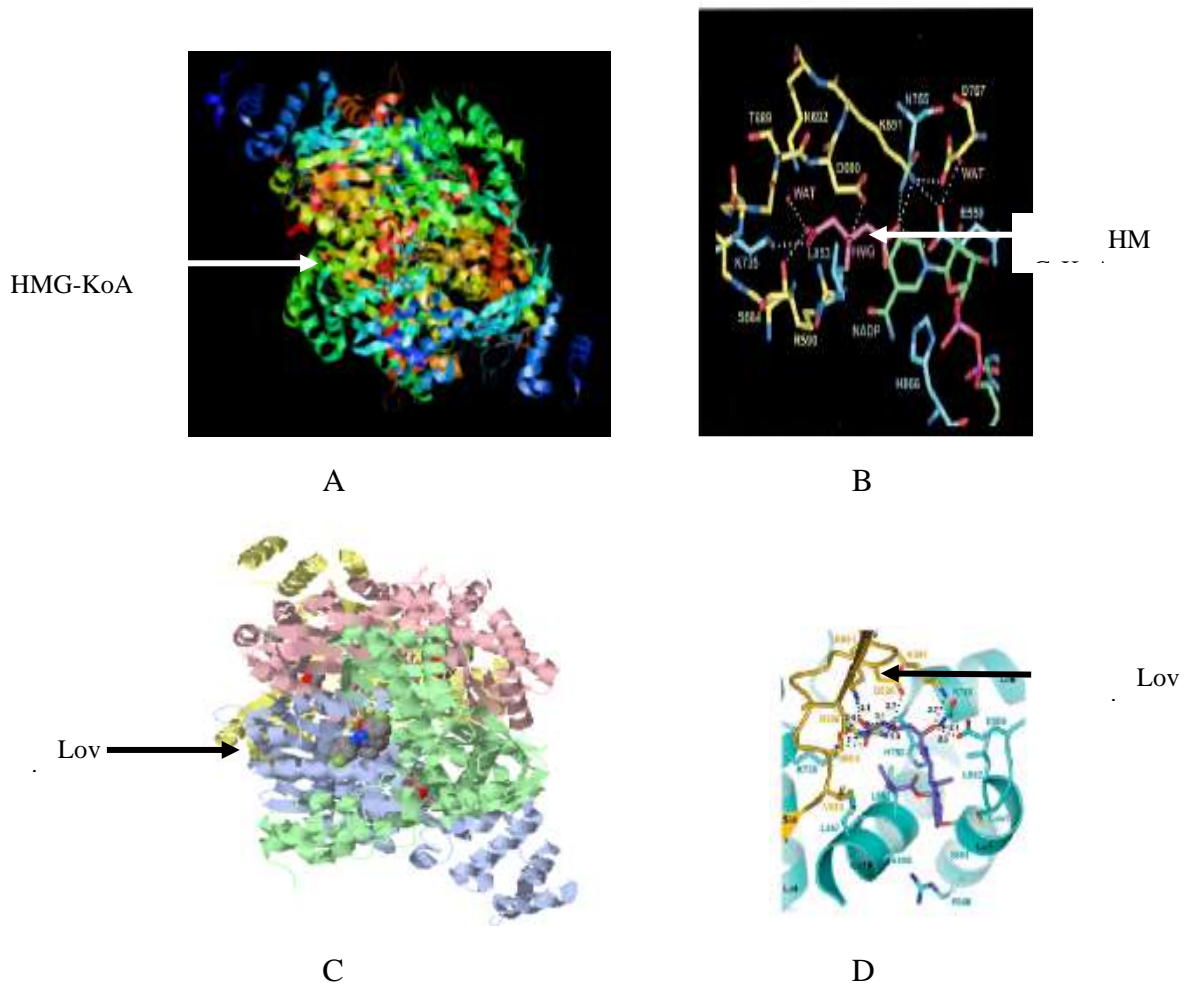
Perbandingan lebih lanjut antara peptida 6.3 kD dengan peptida lain dari beberapa sumber bahan makanan, herbal dan peptida sintetis yang berfungsi dalam penurunan kolesterol mempunyai perbedaan susunan asam amino yang signifikan. Perbedaan susunan asam amino beberapa peptida penurun kolesterol dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8 Perbandingan susunan asam amino peptida penurun kolesterol

| No | Susunan Peptida | Sumber Peptida | Fungsi Peptida | Pustaka |
|----|---|---|--|-----------------------------|
| SE | IPYISASFPLNIEFP | Herbal <i>Senna obtusifolia</i> | Penghambat sintesis kolesterol secara invitro pada sel CHO | Chuhua <i>et al.</i> 2008 |
| | IIAEK | Susu | Penghambat ikatan kolesterol dengan misel | Kirana <i>et al.</i> 2005 |
| | WFILK | Sari kedelai | Pengikat kolesterol | Afifah 2011 |
| | LRKLRKLLR | Sintetis | Pengikat lemak dan kolesterol total | Sharifov <i>et al.</i> 2011 |
| | KGENYNTGVTPN LRPKAAEVVAFLNKE AIEAIAATMKK | Bakteri <i>L. acidophilus</i> | Penghambat HMG-KoA reduktase | Hasil Penelitian ini |

Selama ini mekanisme inhibisi statin sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase bersifat inhibitor kompetitif, sedangkan mekanisme peptida dalam menghambat HMG-KoA reduktase belum diketahui. Statin berikatan dengan sisi aktif enzim yang mengikat substrat HMG-KoA pada beberapa asam amino dalam sisi aktif

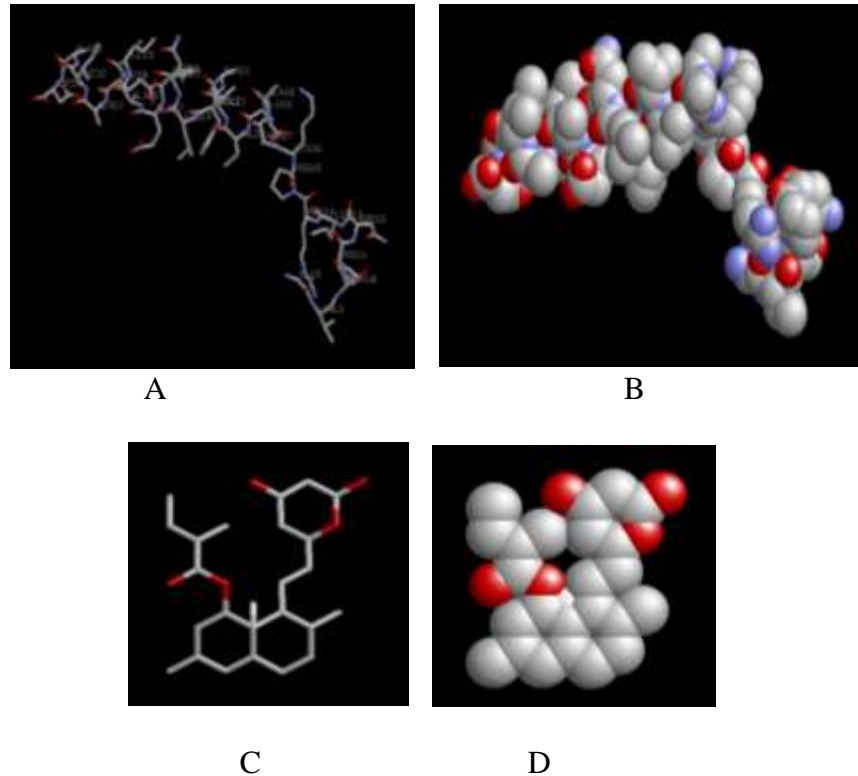
enzim. Atom O pada sisi karboksil (HMG-KoA) berikatan dengan asam amino K735, S684, dan K692 (enzim); atom C pada sisi metil (HMG-KoA) berikatan dengan asam amino L853 (enzim); atom O pada sisi hidroksi (HMG-KoA) berikatan dengan asam amino D690 (enzim); dan atom O pada sisi karbonil (HMG-KoA) berikatan dengan asam amino K691, E559, dan N755 (enzim). Bagian sisi lakton dari statin yang menyerupai subtrat HMG-KoA berkompetisi dalam berikatan dengan sisi aktif enzim (Istvan *et al.* 2000). Struktur 3 dimensi enzim HMG-KoA reduktase dan Sisi aktif pengikatan subtrat HMG-KoA dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Struktur 3 dimensi pengikatan enzim HMG-KoA reduktase dengan subtrat HMG-KoA (A - B) dan lovastatin (B - C). Struktur 3 dimensi enzim diperoleh menggunakan program RasMol dengan data PDB1dq9 (enzim dan subtrat HMG-KoA) dan PDB3cd7 (enzim dan lovastatin). Perbesaran sisi aktif pengikatan bersumber dari Istvan *et al.* 2000

Selain memiliki kesamaan bentuk sisi lakton lovastatin dengan subtrat HMG-KoA, lovastatin juga memiliki ukuran/panjang yang tidak berbeda yaitu 2.00 Å (subtrat HMG-KoA) dan 2.05 Å (lovastatin). Hal ini memungkinkan lovastatin

masuk kedalam sisi aktif dan berikatan dengan enzim. Peptida 6.3 kD dari *L. acidophilus* mampu melakukan inhibisi terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase, ini menunjukkan bahwa peptida ini mampu mengganggu struktur enzim (E) maupun kompleks enzim dan substrat HMG-KoA (ES). Lebih lanjut, untuk mengetahui kemungkinan mekanisme inhibisi peptida 6.3 kD dengan enzim HMG-KoA reduktase dilakukan pemodelan struktur 3 dimensi peptida menggunakan SWISS-MODEL (www.expasy.org) dan program RasMol yang dibandingkan dengan struktur 3 dimensi lovastatin. Hasil perbandingan pemodelan peptida dan lovastatin menggunakan Swiss Model dan RasMol dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24 Model struktur peptida 6.3 kD (A-B) dan lovastatin (C-D) menggunakan SWISS-MODEL dan RasMol

Berdasarkan pada hasil pemodelan struktur 3 dimensi sisi aktif enzim HMG-KoA reduktase, lovastatin dan peptida menggunakan RasMol menunjukkan bahwa peptida 6.3 kD mempunyai bentuk struktur 3 dimensi yang kemungkinan besar tidak bekerja sebagai inhibitor kompetitif HMG-KoA reduktase. Oleh karena itu mekanisme inhibisi peptida 6.3 kD dari *L. acidophilus* terhadap enzim HMG-KoA reduktase diperkirakan berikatan pada lokasi lain di luar sisi aktif enzim (non kompetitif) yang mengganggu struktur pengikatan dengan substrat.

5 SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian menyatakan bahwa ekstrak bekasam mampu mereduksi aktivitas enzim HMG-KoA reduktase seperti halnya *narezushi* dan *heshiko* di Jepang. Bekasam dari ikan seluang memiliki rata-rata inhibisi HMG-KoA reduktase lebih tinggi dibandingkan dengan bekasam dari ikan gabus. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri dari bekasam yang menghasilkan metabolit yang mengandung lovastatin dan memiliki daya inhibisi HMG-KoA reduktase tertinggi dibandingkan bakteri lainnya dari bekasam. Optimasi produksi lovastatin dan daya inhibisi HMG-KoA reduktase menunjukkan bahwa kondisi inkubasi pada suhu 25 °C dan pH 7.0 menghasilkan lovastatin tertinggi (62.90 ppm) dengan daya inhibisi tertinggi (71.43%). Fraksinasi terhadap metabolit inhibitor HMG-KoA reduktase menghasilkan fraksi F4 dan F5 dengan BM kurang dari 3000 Dalton memiliki daya inhibisi tertinggi (93.94%) dan fraksi F3 (87.88%) dengan berat molekul 3000 – 10.000 Dalton. Pada fraksi F4 dan F5 tidak terdapat peptida sehingga lovastatin merupakan metabolit utama dari *L.acidophilus* yang berperan sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase pada Fraksi 4 dan 5. Pada fraksi F3 terdapat 1 peptida tunggal yang juga memiliki daya inhibisi terhadap HMG-KoA reduktase yaitu peptida dengan berat molekul 6.3 kD dan memiliki susunan asam amino KGENYNTGVTPNLRPKAAEVVAFLNKEAIEAIADTMKK.

Saran

Berdasarkan beberapa temuan di atas, hasil penelitian perlu dilanjutkan yang berfokus pada beberapa hal berikut:

1. Pemurnian inhibitor HMG-KoA reduktase yang dihasilkan oleh *L. acidophilus*.
2. Pengujian mekanisme inhibisi peptida 6.3 kD terhadap enzim HMG-KoA reduktase dengan menguji kinetika reaksi enzim yang menghubungkan antara substrat, kecepatan katalitik maksimum (V_{max}) dan konstanta Michaelis-Menten (KM).
3. Kajian penggunaan *L. acidophilus* sebagai starter proses fermentasi bekasam.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe Y, Suzuki T, Ono C, Iwamoto K, Hosobuchi M, Yoshikawa H. 2002. Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 267: 636–646.
- Addy H.S. 2008. Pengaruh sumber karbon terhadap antagonis *Pseudomonas panderflour* pada *Erwina carotovora*. *Jurnal Hayati*. 1: 12-16.
- Afifah E. 2011. Efek penta peptida dan susu kedelai fermentasi steril terhadap profil lipid tikus sprague dawley hiperkolesterolemia. *Tesis UGM* 2011.
- Ataie-Jafari A, Larijani B, Majd H.A, Tahbaz F. 2009. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 54: 22-27.
- Barrios-González J, Miranda RU. 2010. Biotechnological production and applications of statins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85:869–883.
- Burg JS, Espenshade PJ. 2011. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Progres in Lipid Research*. 50: 403-410.
- Chakravarti R, Sahai V. 2004. Compactin-a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 618–624.
- Chen CH, Hu HY, Cho YC, Hsu WH. 2006. Screening of compactin resistant microorganisms capable of converting compactin to pravastatin. *Current Microbiology*. 53:108–112.
- Chen-He, Zhe-Ji, Lie W, Gounei S. 2012. Effects of trehalose, glycerin and NaCl on the growth and freeze-drying of *Lactobacillus Acidophilus*. *Information Technology and Agricultural Engineering: Advances in Intelligent and Soft Computing*. 134 (2012): 967-971.
- Cheng HH, Lai MH. 2000. Fermentation of resistant rice starch producing propionate and reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *The Journal of Nutrition. ProQuest Agriculture Journals*. 130 (8): 1991-1995.
- Chu Hua LI, Mei L, Wenrui C, Baojiang G. 2008. Purification and characterization of a novel cholesterol-lowering protein from the seeds of *Sena obtusifolia*. *Science in China Series C: Life Science*. 5(11): 1020-1024.
- Dansette PM, Jaoen M, Pons C. 2010. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. *Experimental and Toxicological Pathology*. 52: 145-148.
- Danuri H. 2008. Optimizing angkak pigments and lovastatin production By *Monascus purpureus*. *Hayati Journal of Biosciences*. 15 (2): 61-66.
- Delima L, Mihardja, Siswoyo H. 2009. Prevelansi dan faktor determinan penyakit jantung di Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 37(3): 142-159.
- Deraz SF, Hedstrom M, Karlssom EN, Linse S, Khalil AA, Mattiasson B. 2007. Production and physicochemical charazterization of acidocin D20079, bacteriocin produces by *L. acidophilus* DSM 20079. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 911-921.
- Desniar, Rusmana I, Suwanto A, Mubarik NR. Senyawa antimikrobia yang dihasilkan dari mikroorganisme bekasam. *Jurnal Akuatik*. 3(2): 135-145.

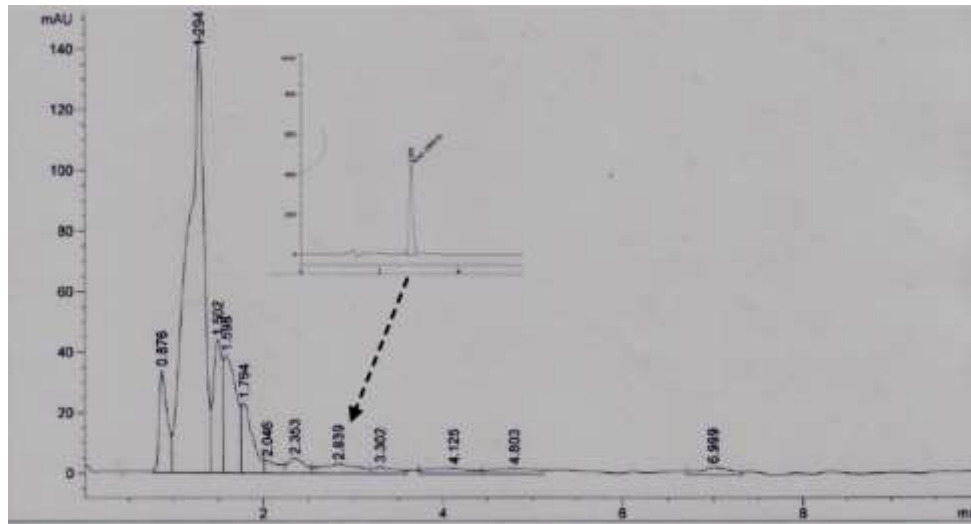
- Ebringer L, Ferencik M, Krajcovic J. 2008. Beneficial health effect of milk and fermented dairy products. *Folia Microbiology*. 53(5): 378-394.
- Ferron MAV, Lopez JLC, Perez JAS, Sevilla JMF, Chisti Y. 2005. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 123-125.
- Friesen JA, Rodwell V. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases. *Genome Biology*. 5:248.
- Giri A, Nasu M, Ohshima T. 2012. Bioactive properties of Japanese fermented fish paste, fish miso, using *koji* inoculated with *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Nutrition and Food Science*. 1(1): 13-22.
- Gupta H, Roger-White C, Handattu S, Garber DW, Datta G, Chaddha M, Dai L, Gianturco SH, Bradley WA, Anantharamaiah GM, 2005. Apolipoprotein E. Mimetic peptide dramatically lowers plasma cholesterol and restores endothelial function in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal American Heart Association*. June 14 (2005): 3112-3118.
- Harsha N, Subbarao S, Sridevi V, Lakshmi MVC, Kiran TK. 2013. Production of mevastatin by solid state fermentation using sesame oil cake. *Research Journal of Pharmaceutical, Biology and Chemical Science*. 4(1): 459-436.
- Istvan ES, Palnitkar M, Buchanan SK, Deisenhofer J. 2000. Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis. *The [European Molecular Biology Organization \(EMBO\) Journal](#)*. 19 (5): 819-830.
- Istvan ES, Deisenhofer J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMGCoA reductase. *Science*. 292: 1160 – 1164.
- Itou K, Akahane Y. 2009. Effect of extract from heshiko , a fermented mackerel product, on cholesterol metabolism in wistar rats. *Fish Science*. 75: 241-248.
- Itou K, Akahane Y. 2010. Effect of extract from narezushi , a fermented mackerel product, on cholesterol metabolism in wistar rats. *Fish Science*. 76: 537-546.
- Jahromi MF, Ling JB, Ho YW, Mohamad R, Goh YM, Shokryazdan P. 2012. Lovastatin Production by *Aspergillus terreus* using agro-biomass as substrate in solid state fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012: 1-11. Doi: 10.1155/2012/196264.
- Javed S, Bukhari SA, Zovia I, Meraj M. 2010. Screening of indigenously isolated fungi for lovastatin production and its in vivo evaluation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 15(4): 422-427.
- Jimenez-Diaz R, Raiz-Barba JL, Cathcart DP, Holo H, Nes IF, Sletten KH, Warner PJ. 1995. Purification and partial amino acid squence of plantaricins. *Applied & Environmental Microbiology*. 16(12): 4459-4463.
- Kato M, Ogawa H, Kishida T, Ebihara K. 2009. The mechanism of the cholesterol-lowering effect of water-insoluble fish protein in ovariectomised rats. *British Journal of Nutrition*. 102: 816–824.
- Kim N, Moon P, Kim S, Choi I, An H, Myung A, Jeong H, Um J, Hong S, Kim H. 2008. Lipid profile lowering effect of Soypro fermented with lactic acid bacteria isolated from Kimchi in high-fat diet-induced obese rats. *Biofactors*. 33: 49–60.

- Kirana C, Rogers PF, Bennett LE, Abeywardena MY, Patten GS. 2005. Rapid screening for potential cholesterol-lowering peptides using naturally derived micelle preparation. *Australian Journal of Dairy Technology*. 60 (2): 163-166.
- Lachenmeier DW, Monakhova YB, Kuballa T, Lobell-Behrends S, Maixner S, Kohl-Himmelseher M, Waldner A, Steffen C. 2012. NMR evaluation of total statin content and HMG-CoA reductase inhibitor in red yeast rice food supplements. *Chinese Medicine*. 7 (8): 1-7.
- Lin CL, Tang YL, Lin SM. 2011. Efficient bioconversion of compactin to pravastatin by the quinoline-degrading microorganism *Pseudonocardia carboxydivorans* isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*. 02: 10187-10193.
- Liyanage R, Han K, Watanabe S, Shimada K, Sekikawa M, Ohba K, Tokuji Y, Ohnishi M, Shibayama S, Nakamori T, Fukushima M. 2008. Potato and soy peptide diets modulate lipid metabolism in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemical*. 72(4): 950-2008.
- Liuhartana R, Harris H. 2013. Identifikasi teknik pengolahan dan analisis kualitas seluang kering pada pengolahan tradisional. [www//litbang.net](http://www.litbang.net). Diakses 5 Januari 2014.
- Lyons KS, Harbinson M. 2009. Statin: in the beginning. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*. 39:362-364.
- Mahesh N, Balakumar S, Indumathi P, Ayyadurai A, Vivek R. 2012. Production and optimization of mevastatin using *Penicillium citrinum* NCIM 768. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 4(1): 001-004.
- Mohania D, Kansal VK, Nagpal R, Yamashiro Y, Marotta F. 2013. Suppression of diet induced hypercholesterolemia by probiotic dahi containing *L. acidophilus* and *L. plantarum*. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 8 (2/3): 75-84.
- Mustafa A, Widodo MA, Kristianto Y. 2012. Albumin and zinc content of snakehead fish extract and its role in health. *International Journal of Science and Technology (IJSTE)*. 1 (2): 1-8.
- Nelson DL, Cox MM. 2010. Lehninger: Principles of biochemistry fourth edition. *CHIME Student CD*, 0-7167-7049-0: 816-831.
- Osman ME, Khattab OH, Zaghlol GM, Abd El-Hameed RM. 2011. Optimization of some physical and chemical factors for lovastatin productivity by local strain of *Aspergillus terreus*. *Australian Journal of Basic and Applied Science*. 5(6): 718-732.
- Park JW, Lee JK, Kwon TJ, Yi DH, Kim YJ, Moon SH, Suh HH, Kang SM, Park YI. 2003. Bioconversion of compactin into pravastatin by *Streptomyces sp.* *Biotechnology Letters*. 25: 1827-1831.
- Park JA, Pichiah PBT, Yu JJ, Oh SH, Daily JW, Cha YS. 2012. Anti-obesity effect of kimchi fermented with *Weissella koreensis* OK1-6 as starter in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Journal Applied Microbiology*. 113: 1507-1516.

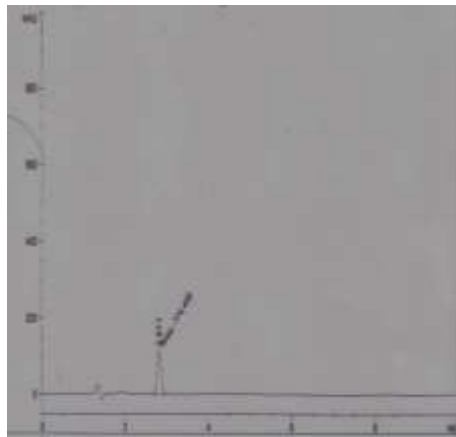
- Pfeiler EA, Azcarate-Peril, Klaenhammer TR. 2007. Characterization of novel bile-induced operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology*. 189(13): 4624-4634.
- Prada-Palomo Y, Romero-Vanegas M, Diaz-Ruis P, Molina-Valasco D, Guzman-Luna C. 2012. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. from biodiesel derived raw glycerol. *Journal CIENCIA Technology*. 5(1): 57-66.
- Ragunath R A, Radhakrisna N, Manikunadan N, Nathiya K, Palaniswamy M. 2012. Optimised production of lovastatin through solid state fermentation by endophytic fungi. *International Journal Pharma of Biosciences*, 3(3): 562-570.
- Rashid SA, Ibrahim D, Anyatha INP. 2013. Effect cultural condition on lovastatin production by *Aspergillus Niger* Sar 1 using combination of rice bran and brown rice as substrate. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 4(2): 150-156.
- Reddy DSR, Latha DP, Latha KPJ. 2011. Production of lovastatin by solid state fermentation by *Penicillium Funiculosum* NCIM 1174. *Drug Invention Today*, 3(6), 75- 77.
- Rhee SJ, Lee JF, Lee, CH. 2011. Importance of lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 10 (55): 1-13.
- Screenivasan A, Natarajan MV. 1966. Sulphur and methionine content of some fresh water fishes of Madras. *Fishery Technology*. 3: 81-82.
- Seenivasan A, Subhagar S, Aravindan R, Viruthagiri T. 2008. Microbial production and biomedical applications of lovastatin. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. November - December 2008: 701-709.
- Shaligram S, Singhal SK, Panday A, Szakeas G. 2009. Compactin production. Studies using *Penicillium brevicompactum* under solid-states fermentation condition. *Applied Biochemistry and Bioethanology*. 159: 505-520.
- Sharifov OF, Nayyur, Garber DW, Handattu SP, Mishra VK, Goldberg D, Anantharamaiah G, Gupta H. 2011. Apolipoprotein E Mimetics and Cholesterol-Lowering Properties. *American Journal of Cardiovaschuler Drug*. 11(6): 371-381.
- Silva GP, Mack M, Contairo J. 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 27: 30-39.
- Tedjautama E, Zubaedah E. 2014. Peningkatan produksi pigmen angkak merah tinggi lovastatin menggunakan co-culture *Monascus purpureus* dan *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(4): 78-88.
- Tobert JA. 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitor. *Nature Reviews*. 2: 517-526.
- US Departmen of Health and Human Services. 2012. Your guide to lowering your cholesterol with therapeutic lifestyle changes (TLC). *US Departmen of Health and Human Services. National Institus of Health. National Hearth, Lung, and Blood Institute*.
- Vandermeer JR, Rollema HS, Sieze RJ, Beerthuyzen MM, Kuipers OP, Vos WM. 1994. Influence of amino acid substitutions in the nisin leader peptide on biosynthesis and secretion of nisin by *L. lactic*. *The Journal of Biological and Chemistry*. 269(5): 3555-3562.
- Victor VM, Apostolova N, Herance R, Hernandez-Mijares A, Rocha M. 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in atherosclerosis:

- Mitochondria-targeted antioxidants as potential therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 16: 4654-4667.
- WHO. 2011. The top 10 causes of death. *www.who.com*. Diakses Februari 2013.
- Wikandari PR. 2011. Potensi bakteri asam laktat indigenous sebagai penghasil angiotensin I converting enzyme inhibitor pada fermentasi bekasam. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada.
- Wikandari PR, Suparmo, Marsono Y, Rahayu ES. 2012. Karakteristik bakteri asam laktat proteolitik pada bekasam. *Jurnal Natur Indonesia*. 14(2): 120-125.
- www.blast.ncbi.nlm.nih.gov. 2015. Standard protein blast. Diakses 18 Oktober 2015.
- www.depkes.go.id. 2013. Situasi kesehatan jantung. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Diakses 28 Mei 2015.
- www.ebi.ac.uk. 2015. Multiple sequence alignment. Diakses 18 Oktober 2015.
- www.expasy.org/structural_bioinformatics/tools/swissmodel. Diakses 11 Februari 2015.
- www.kyotofoodie.com. 2013. Japanese condiment. Diakses 10 Februari 2013.
- www.ncbi.nlm.nih.gov. 2015. Phosphocarrier protein HPr. *Lactobacillus acidophilus*. Sequence ID: gi.6588108006/ref/WP_029780354.1. Diakses Januari 2015.
- www.proteomics.com.au. 2015. Protein identification by MS report S150113RIAL_3502.
- Yamato M, Ozaki K, Ota F. 2003. Partial purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* YIT 0154. *Microbiology Research*. 158: 169-172.
- Yuniarti DW, Sulistiyati TD, Supriyitno E. 2013. Pengaruh suhu pengeringan vakum terhadap kualitas tepung albumin dari ikan gabus. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan Universitas Brawijaya*. 1 (1): 1-9.
- Zhuge B, Fang HY, Yu HY, Rao ZM, Shen W, Song J, Zhuge J. 2008. Bioconversion of lovastatin to a novel statin by *Amycolatopsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 79:209-216.

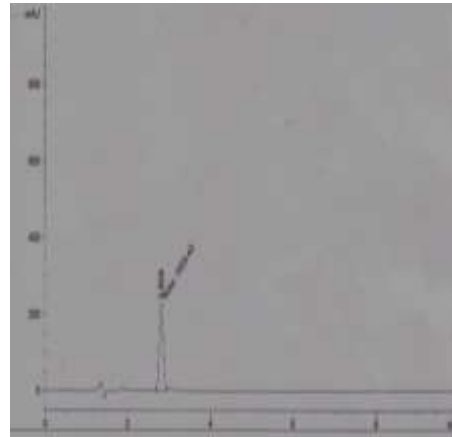
Lampiran 1 Kromatogram Lovastatin dalam ekstrak metabolit *Lactobacillus acidophilus* yang dianalisis menggunakan HPLC λ 237 nm



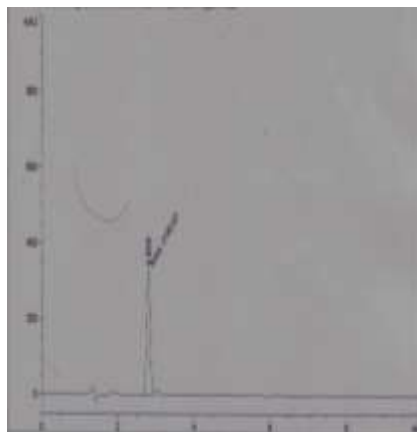
Lampiran 2 Kromatogram standar lovastatin yang dianalisis menggunakan HPLC λ 237 nm



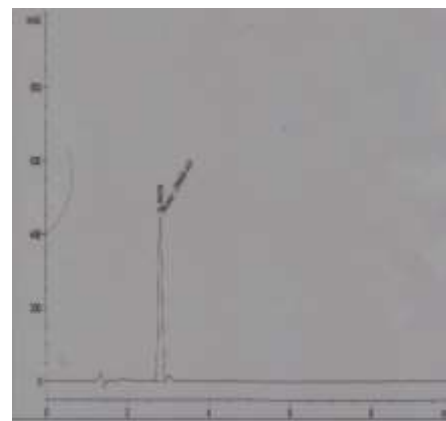
10 ppm



20 ppm



30 ppm



50 ppm



100 ppm

Lampiran 3 Contoh Analisis statistik

ANALISIS ANOVA INHIBISI HMG-KoA REDUKTASE VARIASI SUHU INKUBASI

Welcome to Minitab, press F1 for help.
Retrieving project from file: 'C:\USERS\HP\DOCUMENTS\! PAPA\! HASIL TELITI\2-OPTIMALISASI\ANOVA INHIBISIS VARIASI SUHU.MPJ'

One-way ANOVA: C2 versus C1

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|--------|----|--------|-------|-------|-------|
| C1 | 2 | 963,5 | 481,8 | 10,09 | 0,012 |
| Error | 6 | 286,5 | 47,7 | | |
| Total | 8 | 1250,0 | | | |

S = 6,910 R-Sq = 77,08% R-Sq(adj) = 69,44%

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

| Level | N | Mean | StDev | CI |
|-------|---|--------|-------|---------------|
| 25 | 3 | 77,083 | 3,608 | (-----*-----) |
| 30 | 3 | 56,250 | 6,250 | (-----*-----) |
| 37 | 3 | 54,167 | 9,547 | (-----*-----) |

-----+-----+-----+-----
48 60 72 84

Pooled StDev = 6,910

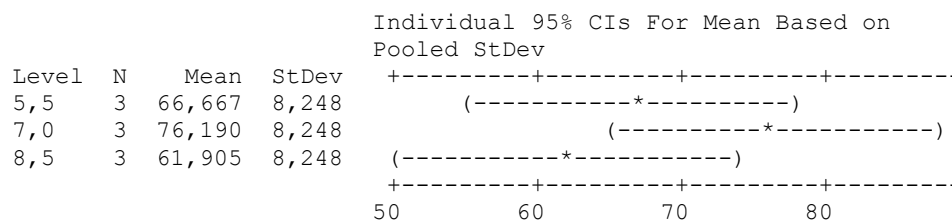
ANALISIS ANOVA INHIBISI HMG-K_oA REDUKTASE VARIASI PH AWAL MEDIA PERTUMBUHAN

Welcome to Minitab, press F1 for help.
 Retrieving project from file: 'C:\USERS\HP\DOCUMENTS\! PAPA\! HASIL TELITI\2-OPTIMALISASI\ANOVA INHIBISI VARIASI PH.MPJ'

One-way ANOVA: C2 versus C1

| Source | DF | SS | MS | F | P |
|--------|----|-------|-------|------|-------|
| C1 | 2 | 317,5 | 158,7 | 2,33 | 0,178 |
| Error | 6 | 408,2 | 68,0 | | |
| Total | 8 | 725,6 | | | |

S = 8,248 R-Sq = 43,75% R-Sq(adj) = 25,00%



Pooled StDev = 8,248

Lampiran 4 Identifikasi Bakteri

Karakteristik isolat C3.4.2 dan L3.3.4

| No | Perlakuan | Isolat C3.4.2 | Isolat L3.3.4 |
|----|----------------|---------------|---------------|
| 1 | Bentuk | Batang | Batang |
| 2 | Pewarnaan Gram | Positif (+) | Positif (+) |
| 3 | Uji Katalase | Negatif (-) | Negatif (-) |
| 4 | Uji Motilitas | Tidak motil | Tidak Motil |

Fermentasi gula (API CH50 dan CHL)

| o. Kode | N | | I | | o. Kode | N | | I | |
|------------|------------------------------|--------------|--------------|------------|-------------------|--------------|--------------|---|--|
| | Jenis Gula | solat C3.4.2 | solat L3.3.4 | Jenis Gula | | solat C3.4.2 | solat L3.3.4 | | |
| 0 | Kontr | - | - | 2 | Escul | + | + | | |
| | ol | | | 5 | in Ferric Citrate | | | | |
| 1 | Glyce | - | - | 2 | Salici | + | + | | |
| | rol | | | 6 | n | | | | |
| 2 | Erytri | - | - | 2 | D- | + | + | | |
| | tol | | | 7 | Cellobiose | | | | |
| 3 | D- | - | - | 2 | D- | + | + | | |
| | Arabinose | | | 8 | Maltose | | | | |
| 4 | L- | - | - | 2 | D- | - | - | | |
| | Arabinose | | | 9 | Lactose | | | | |
| 5 | D- | - | - | 3 | D- | - | - | | |
| | Ribose | | | 0 | Melibiose | | | | |
| 6 | D- | - | - | 3 | Sacc | - | + | | |
| | Xylose | | | 1 | charose | | | | |
| 7 | L- | - | - | 3 | D- | - | + | | |
| | Xylose | | | 2 | Trehalose | | | | |
| 8 | D- | - | - | 3 | Inuli | - | - | | |
| | Adonitol | | | 3 | n | | | | |
| 9 | Meth | - | - | 3 | D- | - | - | | |
| | yl-B-D- Xyloprynosi de | | | 4 | Melezitose | | | | |
| 1 | D- | - | - | 3 | D- | - | - | | |
| 0 | Galactose | | | 5 | Raffinose | | | | |
| 1 | D- | + | + | 3 | Amid | - | - | | |
| 1 | Glucose | | | 6 | on | | | | |
| 1 | D- | + | + | 3 | Glyc | - | - | | |
| 2 | Fructose | | | 7 | ogen | | | | |
| 1 | D- | - | - | 3 | Xylit | - | - | | |
| 3 | Mannose | | | 8 | ol | | | | |
| 1 | L- | - | - | 3 | Genti | + | + | | |
| 4 | Sorbose | | | 9 | obiose | | | | |
| 1 | L- | - | - | 4 | D- | - | - | | |
| 5 | Rhamnose | | | 0 | Turanose | | | | |
| 1 | Dulco | - | - | 4 | D- | - | - | | |
| 6 | tol | | | 1 | Lyxose | | | | |
| 1 | Inosit | - | - | 4 | D- | - | - | | |
| 7 | ol | | | 2 | Tagatose | | | | |
| 1 | D- | - | - | 4 | D- | - | - | | |
| 8 | Mannitol | | | 3 | Fucose | | | | |

| | | | | | | | |
|------------|-------------|-----------------|---|---|--------------|---|---|
| 1 | D- | - | - | 4 | L- | - | - |
| 9 | Sorbitol | | | 4 | Fucose | | |
| 2 | Meth | - | - | 4 | D- | - | - |
| 0 | yl-a-D— | | | 5 | Arabitol | | |
| | Mannopyran | | | | | | |
| | osidase | | | | | | |
| 2 | Meth | - | - | 4 | L- | - | - |
| 1 | yl-a-D- | | | 6 | Arabitol | | |
| | Glucopyrano | | | | | | |
| | sidase | | | | | | |
| 2 | N- | - | - | 4 | Rotas | - | - |
| 2 | Acetyl | | | 7 | sium | | |
| | Glucosamine | | | | Gluconate | | |
| 2 | Amy | + | + | 4 | Rotas | - | - |
| 3 | gdalin | | | 8 | sium 2-keto- | | |
| | | | | | Gluconate | | |
| 2 | Arbut | + | + | 4 | Rotas | - | - |
| 4 | in | | | 9 | sium 5-keto- | | |
| | | | | | Gluconate | | |
| Kesimpulan | | C3.4.2 : | | <i>Lactobacillus delbruckii sp. delbruckii.</i> | | | |
| | | L3.3.4 : | | <i>Lactobacillus acidophilus</i> | | | |

Ket. - : gula terfermentasi
 +: gula tidak terfermentasi

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Tambahmulyo, Wates Kabupaten Pringsewu, Lampung pada tanggal 1 Juni 1976 dari pasangan Bapak Waris dengan Ibu Roliyah dan merupakan anak keempat dari 4 bersaudara. Penulis menikah dengan Dr. Yunindyawati, S.Sos, M.Si dan dikaruniai 3 orang anak, yaitu Muhammad Barid Fathan Hanan (11 tahun), Muhammad Hafid Hanafi (Alm), dan Muhammad Luthfi Hanafi (7 tahun).

Pendidikan Sarjana penulis dimulai pada tahun 1995 melalui jalur Undangan Seleksi Masuk IPB (USMI) dan diterima sebagai mahasiswa S1 pada program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor, kemudian lulus pada tahun 1999. Pada tahun 2004 penulis melanjutkan studi S2 di Program Studi Ilmu dan Teknologi Pangan, Sekolah Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada dan lulus tahun 2006. Pada tahun 2011, penulis diterima sebagai mahasiswa Program Doktor (S3) di Program Ilmu Pangan, Sekolah Pasca Sarjana IPB dengan sponsor dari Direktorat Pendidikan Tinggi melalui Beasiswa Program Pascasarjana (BPPS 2011).

Pengalaman kerja penulis diawali di PT. Dharma Samudera Fishing Industries Tbk. dari tahun 2000-2001. Kemudian di tahun 2001 penulis diterima sebagai dosen pada Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya sampai sekarang.

Selama menjadi mahasiswa program doktor, kegiatan ilmiah yang penulis lakukan yaitu sebagai pemakalah pada Seminar Nasional dan Pertemuan Tahunan Ke-3 Masyarakat Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia di IPB Bogor, sebagai pemakalah poster pada *International Symposium on Aquatic Processing Product* di Bogor, peserta pada *Agricultural Biotechnology Workshop* yang diadakan oleh SEAFST IPB bekerjasama dengan Michigan State University, USDA dan ISAAA, serta peserta pada *Food Biotechnology Communicating, Media Relations and Multi-Sectoral Collaboration Training Workshop* yang diselenggarakan IndoBic, USDA dan ISAAA. Karya ilmiah yang dipublikasikan pada beberapa jurnal selama menjadi mahasiswa yaitu: Aktivitas Penghambatan Isolat BAL dari Ikan Nila dan Tongkol terhadap Bakteri Merugikan Produk Perikanan (Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia Vol. 15. No. 2 Tahun 2012 terakreditasi DIKTI), Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Penghasil Inhibitor HMG-CoA Reduktase dari Bekasam sebagai Agen Pereduksi Kolesterol pada Jurnal Agritech Volume 35 No. 3 Agustus 2015 terakreditasi DIKTI, *Potency of Bekasam (Indonesia fermented fish product) as a HMG-CoA Reductase Inhibitor* diterbitkan pada *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science* Vol. 4 (8) August 2015 terindeks Scopus dan *Lactobacillus acidophilus Isolated from Bekasam (Indonesian fermented fish) Produced HMG-CoA Reductase Inhibitors* pada *Journal of Functional Food (under review)*, terindeks Scopus IF 3.5.