

PENGARUH DEGRADASI ENZIM PROTEOLITIK TERHADAP AKTIVITAS ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR BEKASAM DENGAN *Lactobacillus plantarum* B1765

The Effect of Degradation of Proteolytic Enzyme on Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Activity of Bekasam with *Lactobacillus plantarum* B1765

Prima Retno Wikandari, Lenny Yuanita

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya,
Gedung C5, Kampus Unesa Ketintang Surabaya 60231
Email: wikandari@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh degradasi enzim pencernaan proteolitik terhadap stabilitas peptida dan aktivitas *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor* (ACEI) bekasam yang difermentasi dengan kultur starter *Lactobacillus plantarum* B1765. Terhadap ekstrak bekasam diberi perlakuan enzim proteolitik pepsin dan tripsin. Pengujian stabilitas peptida diukur dengan ada tidaknya perubahan jumlah peptida setelah perlakuan enzim menggunakan metode formol, sedangkan aktivitas ACEI dilakukan dengan mengetahui jumlah asam hipurat dari substrat Hip-His-Leu yang dibebaskan oleh ACE diukur dengan spektrofotometer. Hasil pengujian menunjukkan perlakuan enzim proteolitik tidak berpengaruh pada konsentrasi peptida dengan $p > 0,05$ dengan nilai rata-rata konsentrasi peptida sebesar 36,72. Hal ini berkorelasi dengan aktivitas ACEI yang juga menunjukkan tidak ada pengaruh antara perlakuan sebelum dan setelah degradasi enzim ($p > 0,05$) dengan rata-rata aktivitas ACEI sebesar 70,73. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas ACEI bekasam tidak berubah jika mengalami degradasi enzim pencernaan.

Kata kunci: Bekasam, fermentasi ikan, peptida, ACE inhibitor

ABSTRACT

This research studied the effect of digestive enzyme degradation on the Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACEI) activity and the stability of *bekasam* peptide and ACEI activity. Water extract of *bekasam* was subjected to pepsin and trypsin. The stability of peptide was measured from the changes of peptide concentration before and after treatment by those enzymes. The stability of ACEI activity was measured by hypuric acid liberated from Hip-His-Leu as ACE substrate and determined by spectrophotometer. The results showed that proteolytic enzyme degradation did not affect the concentration of peptide ($p > 0,05$) and the mean concentration 36.72. It was closely related with the ACEI activity that did not change significantly before and after digestion by pepsin and trypsin ($p > 0,05$) and the mean ACEI activity was 70.73. It showed that ACEI activity of *bekasam* did not change by the degradation of digestive enzyme.

Keywords: *bekasam*, fermented fish, peptides, ACEI activity

PENDAHULUAN

Bekasam adalah salah satu jenis produk fermentasi ikan dengan campuran garam dan nasi. Sebagai salah satu jenis makanan tradisional Indonesia, jenis makanan ini hampir tidak lagi dikenal oleh masyarakat umum, padahal makanan sejenis bekasam seperti *plachom* (Thailand), *burong isda* (Philipina) sangat dikenal di negaranya dan telah memasuki

pasaran internasional. Hal yang perlu dilakukan untuk mengangkat citra bekasam adalah dengan mengetahui khasiat dan keunggulan bekasam sebagai makanan tradisional. Telah dilakukan serangkaian penelitian terkait dengan potensi bekasam sebagai pangan antihipertensi.

Berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan peneliti, diketahui bahwa bekasam dengan proses fermentasi spontan mempunyai aktivitas Angiotensin

Converting Enzyme Inhibitor (ACEI) (Wikandari dkk., 2012a). ACE adalah enzim yang mengubah Angiotensin I menjadi Angiotensin II yang menyebabkan adanya vasokonstriksi yang menjadi salah satu penyebab terjadinya hipertensi, sehingga penghambatan terhadap aktivitas ACE akan menghambat terjadinya hipertensi (Acharya dkk., 2003).

Aktivitas ACEI dihasilkan dari adanya peptida yang mempunyai aktivitas sebagai ACEI yang dihasilkan dari aktivitas proteolitik bakteri asam laktat selama proses fermentasi bekasam. Belum dilakukan penelitian lebih lanjut tentang jenis peptida pada bekasam yang menghasilkan aktivitas antihipertensi, walaupun peptida ACEI telah banyak diteliti pada proses fermentasi susu dengan kultur starter beberapa jenis bakteri asam laktat yaitu *Lactobacillus helveticus* CP790, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS, *L. lactis* subsp. *cremoris* FT 4 (Gobetti dkk., 2000; Yamamoto dkk., 2003; Seppo dkk., 2003; Muguerza dkk., 2006). Penelitian ACE inhibitor pada proses fermentasi ikan lainnya juga belum banyak diteliti. Penelitian yang telah dilakukan terkait ACE inhibitor dari produk fermentasi ikan adalah *Heshiko* dan *narazhuji*, produk fermentasi ikan tradisional Jepang, diketahui menunjukkan aktivitas ACEI dan mampu menurunkan tekanan sistol *Spontaneously Hypertension Rat* (SHR), akan tetapi belum diidentifikasi jenis peptida ACEI pada produk tersebut. (Itou dan Akahane, 2004; Itou dkk., 2007)

Karena ada dugaan bahwa aktivitas ACEI disebabkan oleh peptida yang dihasilkan dari aktivitas proteolitik bakteri asam laktat yang tumbuh pada bekasam, maka selanjutnya telah dilakukan penelitian untuk menemukan isolat bakteri asam laktat (BAL) dengan aktivitas proteolitik tinggi yaitu *Lactobacillus plantarum* N2352, *L. plantarum* T2565, *L. plantarum* B1765, *L. plantarum* B1465, *L. pentosus* B2555 dan *Pediococcus peptonosaceus* B1661 (Wikandari dkk., 2011), dan diketahui bahwa *L. plantarum* B1765 menghasilkan aktivitas ACEI tertinggi (68,17±1,32%) dibandingkan isolat bekasam proteolitik lainnya (Wikandari dkk., 2012b). Hasil ini menunjukkan hasil yang mirip dengan aktivitas ACEI hasil hidrolisis protein ikan dengan enzim protease non mikroorganisme dengan aktivitas penghambatan antara 63-79% (Bougatef dkk., 2008; Balti dkk., 2010).

Berdasarkan temuan-temuan tersebut maka bekasam yang dihasilkan dengan fermentasi menggunakan kultur starter *L. plantarum* B1765, berpotensi untuk dikembangkan sebagai pangan fungsional antihipertensi, namun masih perlu kajian lebih lanjut bagaimana pengaruh degradasi enzim proteolitik pencernaan terhadap stabilitas peptida yaitu ada tidaknya perubahan jumlah peptida dan aktivitas ACEI pada bekasam sebelum dan sesudah didegradasi oleh enzim pencernaan *pepsin* dan *trypsin*. Hal ini perlu dilakukan mengingat untuk dapat berfungsi sebagai pangan antihipertensi, maka setelah

dikonsumsi peptida ACEI harus stabil terhadap degradasi enzim pencernaan. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui resistensi peptida hasil fermentasi bekasam terhadap degradasi enzim dan stabilitasnya aktivitas ACEI proteolitik akibat degradasi enzim pencernaan proteolitik.

METODE PENELITIAN

Persiapan Kultur Starter

Stock isolat *L. plantarum* B1765 dalam MRS (Oxoid) yang telah diregenerasi selama 24 jam pada suhu 37 °C, selanjutnya diambil sebanyak 1% untuk diinokulasi kedalam 10 mL MRS dan diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Kultur yang tumbuh selanjutnya dipisahkan dengan cara dilakukan sentrifugasi selama 5 menit pada 3500 rpm, supernatant didekantasi dan residu pellet diresuspensi didalam 10 mL larutan steril NaCl 0,85% dan dilakukan sentrifugasi kembali untuk memisahkan MRS. Pellet diresuspensi didalam 10 mL larutan NaCl steril 0,85% dan disimpan pada suhu 4 °C sebelum diinokulasikan pada ikan yang telah diberi nasi dan garam.

Pembuatan Bekasam

Ikan bandeng berat ± 100 gram yang digunakan mula-mula dibersihkan sisik, isi perut, dan insanganya, kemudian dicuci sampai bersih. Ikan bandeng yang telah dibersihkan ditambahkan garam dengan rasio ikan : garam adalah 10 : 1 sampai merata, selanjutnya ditempatkan di dalam wadah tertutup. Setelah 2 hari penggaraman ditambahkan nasi dengan rasio ikan : nasi = 1:1 dan ditambahkan bakteri asam laktat *Lactobacillus plantarum* B1765 sebanyak 10⁶ CFU/gram. Selanjutnya bekasam difermentasi selama 7 hari. Bekasam control dibuat dengan fermentasi spontan tanpa penambahan kultur starter.

Pembuatan Ekstrak Bekasam

Sebanyak ± 10 mg bekasam dihomogenasi dengan 100 mL aquadest, dan selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 10.000 x g selama 20 menit. Supernatan dipisahkan, dan pada residu ditambahkan 50 ml aquadest dan dilakukan sentrifugasi kembali. Supernatan ke dua dicampurkan dengan supernatan pertama dan disaring dengan Whatman No 2, dan ditepatkan sampai 200 mL dengan aquadest.

Degradasi Enzim *Pepsin* dan *Trypsin*

Prosedur degradasi enzim pepsin dan tripsin menggunakan metode Kuba dkk. (2003). Sebanyak 0,2 mL larutan sampel diinkubasi dengan 0,2 mL pepsin (*Sigma Chemical Co.*), 0,05% (w/v) (dalam buffer KCl-HCl 0,1 M pH 2) atau tripsin (*Sigma Chemical Co.*) (dalam *buffer* potassium

fosfat 0,1 M pH 8) dan 0,2 ml buffer selama 6 jam pada 37 °C. Reaksi dihentikan dengan mendidihkan pada *water bath* selama 5 menit untuk dilakukan pengujian kadar peptida dan aktivitas ACEI. Sampel dengan perlakuan pepsin selanjutnya dievaporasi sampai kering. Diinkubasi dengan 0,2 ml tripsin 0,05% (w/v) (dalam *buffer* potassium fosfat 0,1 M pH 8) dan 0,4 ml *buffer* potassium fosfat 0,1 M pH 8 selama 6 jam pada 37 °C. Reaksi dihentikan dengan mendidihkan pada penangas air selama 5 menit.

Pengujian Kadar Peptida

Pengujian kadar peptida ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode titrasi formol. Prosedurnya adalah 10 mL ekstrak sampel dimasukkan dalam erlenmeyer 100 mL. Sampel ditambahkan 20 mL aquades dan ± 1 mL indikator PP. Kemudian sampel dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berwarna merah muda. Sampel ditambah 2 mL larutan formaldehid 40% dan dititrasi kembali dengan NaOH. Perhitungan protein dapat dilakukan dengan rumus:

$$\%N = \frac{a}{b \times 10} \times N \text{ NaOH} \times Ar \text{ N} \times fp \quad (1)$$

Keterangan:

a = volume titrasi formol

b = berat sampel

fp = faktor pengenceran

Pengujian Aktivitas ACE Inhibitor

Pengujian aktivitas ACE inhibitor dilakukan menurut metode Chusman dan Cheung, (1971). Sebanyak 1 mL larutan sampel dilakukan sentrifugasi (10.000 x g, 40 menit), diatur pH nya pada pH 8,3 dengan penambahan NaOH 10 N, selanjutnya 65 μ L larutan sampel ditambah substrat ACE yaitu tripeptida Hip-His-Leu (Sigma-Aldrich) (5 mM Hip-His-Leu dalam 0,1 M buffer sodium borat yang mengandung 0,3 M NaCl pada pH 8,3) dan di pre-inkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit, selanjutnya campuran diinkubasi dengan 25 μ L enzim ACE (Sigma-Aldrich) 2,5 mUnit/mL pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 μ L HCl 1 M. Asam hipurat yang dibebaskan diekstraksi dengan 0,5 mL etil asetat. Setelah dicentrifuse (800 x g selama 2 menit), sebanyak 0,2 mL lapisan atas dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dievaporasi pada suhu 100 °C selama 30 menit. Asam hipurat selanjutnya dilarutkan dalam 1,0 mL aquadest, diukur absorbansinya pada 288 nm menggunakan spektrofotometer.

$$\% \text{ penghambatan} = (A-B)/(A-C) \times 100\% \quad (2)$$

Keterangan:

A= absorbansi enzim ACE + substrat

B= absorbansi sampel + enzim ACE + substrat

C= absorbansi substrat + sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stabilitas Peptida Bekasam

Stabilitas peptida bekasam akibat degradasi enzim pencernaan ditinjau dari ada tidaknya jumlah peptida sebelum degradasi dan setelah degradasi oleh enzim pepsin dan tripsin. Data jumlah peptida hasil degradasi ekstrak bekasam seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Jumlah peptida ekstrak bekasam akibat degradasi enzim proteolitik pencernaan

Jenis perlakuan	Peptida (%)
Kontrol	35,58 $\pm$ 2,14
Pepsin	38,42 $\pm$ 3,29
Tripsin	37,71 $\pm$ 3,18
Pepsin + Tripsin	36,29 $\pm$ 3,69

Hasil analisis ANOVA satu arah menunjukkan bahwa perlakuan enzim tidak berpengaruh terhadap total peptida yang dihasilkan ($F=1,031$; $p=0,415$). Kadar peptida tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan nilai rata-rata 36,72%. Hal ini menunjukkan bahwa peptida dalam ekstrak bekasam bersifat resisten terhadap degradasi enzim proteolitik pepsin yang ada di dalam lambung, maupun enzim tripsin yang dihasilkan oleh pankreatin.

Sebagian besar enzim di dalam saluran pencernaan merupakan enzim endopeptidase yaitu enzim yang cenderung mendegradasi ikatan peptida pada bagian dalam struktur protein dan bukan pada yang merupakan ujung N dan ujung C. Dengan demikian kemungkinan enzim pencernaan menjadi kurang berperan untuk memecah peptida pendek. Jika Peptida ACE inhibitor masih ada dalam bentuk peptida yang relatif lebih panjang, maka peptida ini masih memungkinkan untuk dapat didegradasi oleh endopeptidase yang terdapat pada saluran pencernaan, menghasilkan peptida lebih pendek dan mempunyai aktivitas antihipertensi yang lebih tinggi daripada peptida induknya.

Resistensi peptida terhadap degradasi proteolitik enzim-enzim pencernaan sangat ditentukan oleh komposisi dan urutan asam-asam amino pada rantai primernya. Peptida dan residu prolin dan hidroksi prolin diketahui lebih resisten terhadap hidrolisis enzim pencernaan. Yamamoto (2003) menunjukkan bahwa Ile-Pro-Pro, dan Val-Pro-Pro diketemukan di dalam sirkulasi darah yang berarti peptida ini resisten terhadap enzim pencernaan dan dapat melalui dinding membrane sel. Gobetti dkk. (2000) juga menemukan peptida ACE inhibitor pada susu fermentasi dengan 5-7 residu asam amino dan dan menunjukkan resistensi terhadap hidrolisis enzim tripsin dan kimotripsin. Peptida dengan 2-3 residu antara lain

Asp-Leu-Pro dan Asp-Gly, Val-Pro-Prodiketahui peptida ini stabil terhadap perlakuan pH, suhu dan hidrolisis protease gastrointestinal invitro (Wu dan Ding, 2007; Masuda dkk., 1996). Aktivitas ACE inhibitor dari beberapa susu komersial telah disimulasikan dengan hidrolisis enzim pencernaan. Tidak ada perubahan yang signifikan atau adanya kenaikan aktivitas penghambatan ACE setelah hidrolisis dengan enzim pencernaan (Hernández dkk., 2004).

Dari hasil-hasil penelitian tersebut maka diduga bahwa peptida yang dihasilkan selama proses fermentasi bekasam adalah peptida-peptida pendek di, tripeptida atau pentapeptida yang sudah tidak dapat didegradasi lebih lanjut baik oleh enzim protease pepsin maupun peptidase tripsin. Sebagian besar peptida yang mempunyai efek antihipertensi adalah peptida pendek, di atau tripeptida, walaupun juga dijumpai peptida dengan 9 sampai 11 residu asam amino (Yamamoto, 2003; Fujita dkk., 2000). Nateshs dkk. (2003) telah menunjukkan dari studi kristalografi bahwa sisi aktif ACE tidak dapat mengakomodasi peptida-peptida dengan ukuran besar.

Stabilitas Aktivitas ACEI

Stabilitas ACEI akibat degradasi enzim pencernaan perlu dikaji mengingat bekasam akan dikonsumsi, sehingga walaupun ekstrak bekasam telah diketahui mempunyai aktivitas ACEI, akan tetapi bagaimana resistensi peptida bioaktif ACEI terhadap pengaruh enzim-enzim pencernaan proteolitik pencernaan harus dikaji untuk diketahui khasiat bekasam sebagai pangan antihipertensi.

Tabel 2. Aktivitas ACEI ekstrak bekasam akibat degradasi enzim proteolitik pencernaan

Jenis perlakuan	Aktivitas ACEI (%)
Kontrol	71,54 ± 1,49
Pepsin	69,02 ± 1,52
Tripsin	69,87 ± 1,91
Pepsin + Tripsin	72,48 ± 1,29

Hasil analisis Anova satu arah menunjukkan bahwa perlakuan enzim tidak berpengaruh terhadap aktivitas penghambatan ACE ($F=3,557$; $p=0,067$). Pengaruh perlakuan enzim tidak menghasilkan perbedaan yang nyata terhadap aktivitas penghambatan. Rata-rata aktivitas penghambatan adalah 70,73. Data ini menunjang data tentang resistensi peptida bekasam oleh enzim-enzim pencernaan, karena tidak ada perubahan komposisi peptida, maka aktivitasnya sebagai ACE inhibitor juga relatif tetap. Beberapa peptida ACE inhibitor juga dapat didegradasi lebih lanjut oleh enzim pencernaan dan menghasilkan aktivitas penghambatan yang

lebih tinggi dibandingkan peptida induknya. Peptida ACE inhibitor Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln, yang dihasilkan dari fermentasi susu dengan *L. helveticus* CP790 menunjukkan aktivitas penghambatan yang relatif kecil ($IC_{50} > 1000 \mu M$), akan tetapi peptida yang lebih pendek Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro yang dihasilkan dari hidrolisis enzim pankreatik peptida induknya menunjukkan aktivitas inhibitor ACE yang relatif lebih tinggi ($IC_{50} = 5 \mu M$) (Yamamoto dkk., 2003).

Fujita dan Yoshikawa (1999) melakukan studi *in vivo* aktivitas penghambatan terhadap ACE dari Peptida ACE inhibitor yang dihasilkan dari ikan bonito kering. Dari 8 Peptida ACE inhibitor yang dihasilkan, peptida Leu-Lys-Pro-Asp-Meth yang dihidrolisis menghasilkan Leu-Lys-Pro memberikan nilai penurunan tekanan sistole 8 kali lipat lebih tinggi dibandingkan peptida induknya. Berdasarkan hasil-hasil penelitian ini maka diketahui bahwa beberapa peptida dengan residu asam amino yang lebih banyak juga dapat menghasilkan aktivitas ACEI, akan tetapi dengan nilai yang lebih kecil dan masih dapat terhidrolisis oleh enzim pencernaan menjadi peptida yang lebih pendek dengan aktivitas ACEI yang lebih besar.

Dari fakta tersebut maka kemungkinan bahwa peptida yang dihasilkan selama fermentasi bekasam dengan kultur starter *L. plantarum* B1765 adalah peptida pendek yang sudah tidak mampu lagi didegradasi oleh enzim-enzim pencernaan sehingga juga tidak memberikan perubahan terhadap aktivitas ACEI. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa ACEI dihasilkan dari hasil degradasi ekstraseluler proteinase bakteri asam laktat yang menghasilkan peptida yang beragam, akan tetapi mayoritas adalah pendek 2-5 residu asam amino (Yamamoto dkk., 1994, Maeno dkk., 1996, Minervini dkk., 2003).

Jika dikaitkan dengan struktur peptida dalam penghambatannya terhadap enzim ACE, walaupun tidak selalu pasti, sebagian besar dari peptida yang mempunyai aktivitas penghambatan terhadap ACE yang besar mempunyai residu prolin, lisin atau arginin pada ujung karboksilat peptida tersebut. Peptida-peptida tersebut juga merupakan peptida pendek dengan 2 sampai 12 asam amino. Pada umumnya residu prolin, lisin dan arginin pada ujung karboksilat berperan dalam berikatan dengan sisi aktif enzim ACE melalui ikatan ionik, ikatan Hidrogen maupun kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan atom Zn pada sisi katalitik enzim (FirtzGerald dkk., 2004; Meisel, 1998).

KESIMPULAN

Peptida yang dihasilkan selama proses fermentasi bekasam stabil terhadap degradasi enzim pencernaan pepsin dan tripsin. Aktivitas ACEI juga relatif tidak berubah sebelum dan setelah mengalami degradasi enzim pencernaan pepsin

dan tripsin dan menghasilkan aktivitas penghambatan yang relatif tinggi. Dengan demikian bekasam berpotensi untuk dapat dikembangkan menjadi pangan fungsional antihipertensi.

DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, K.R., Sturrock, E.D., Riordam, J.F. dan Ehlers, M.R.W. (2003). ACE revisited: a new target for structure based drug design. *Nature Review Drug Discovery* **2**(11):891-902.
- Balti, R., Naima, N-A., Ali, B., Didier, G. dan Moncef, N. (2010). Three novel ACE inhibitory peptides from cuttle fish (*Sepia officinale*) using digestive protease. *Food Research International* **43**(3):1136-1143.
- Bougatef, A., Naima, N-A., Rozen, R-P., Yves, L., Didier, G., Ahmed, B. dan Moncef, N. (2008). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine protease. *Food Chemistry* **111**(2): 350-356.
- Cushman, D.W. dan Cheung, H.S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemistry Pharmacology* **20**(7): 1637-1648.
- FitzGerald, R.J., Murrai, B.A. dan Walls, D.J. (2004). Hypotensive peptides from milk protein. *The Journal of Nutrition* **134**(4):9805-9885.
- Fujita, H., Yokohama, K. dan Yoshikawa, M. (2000). Clasification and antihypertensive activity of angiotensin -I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science* **65**(4): 564.
- Fujita, H. dan Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* **44**(1-2): 123-127.
- Gobetti, M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. dan Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milk started by *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(9):3898-3904.
- Hernández-Ledesma, B., Lourdes, A., Mercedes, R. dan Isidra, R. (2004). Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in commercial fermented products. Formation of peptides under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **52**(6): 1504-1510.
- Itou, K. dan Akahane, Y. (2004). Antihypertensive effect of *heshiko*, a fermented mackarel product, on spontaneously hypertensive rat. *Fisheries Science* **70**(6):1121-1129.
- Itou, K., Nagahashi, R., Saitou, M. dan Akahane, Y. (2007). Anantihypertensive effect of *narazushi*, a fermented mackarel product, on spontaneously hypertensive rat. *Fisheries Science* **73**: 1344-1352.
- Wu, J. dan Ding, X. (2007). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin – I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International* **35**: 367-375.
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S. dan Takeda, Y. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **67**(6): 1278-1283.
- Maeno, M., Yamamoto, N. dan Takeno, T. (1996). Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science* **79**(8):1316-1321.
- Masuda, O., Nakamura, Y. dan Takano, T. (1996). Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutrition* **126**(12):3063-3068.
- Meisel, H. (1998). Overview on milk protein-derived peptides. *International Dairy Journal* **8**(5-6):363-373.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello, C.G., Fox, P.F., Monnet, V. dan Gobetti, M. (2003). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial of milk from six species. *Applied and Enviromental Microbiology* **69**(9):5297-5305.
- Muguerza, B., Ramos, M., Sanches, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A. dan Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal* **16**(1):61-69.
- Natesh R., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D. dan Acharya, K.R. (2003). Human Angiotensin converting enzym: structure revealed . *Nature* **421**:551-554.
- Seppo L., Jauhininen, T., Poussa, T. dan Korpela, R. (2003). A Fermented milk high in bioactive peptides has blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* **77**(2):326-330.

- Wikandari, P.R., Marsono, Y., Suparmo dan Rahayu, E.S. (2011). Pontensi bekasam bandeng (*Chanos-chanos*) sebagai sumber angiotensin I converting enzyme inhibitor. *Biota* **16**(1):145-152.
- Wikandari, P.R., Marsono, Y., Suparmo, dan Rahayu, E.S. (2012a). Karakterisasi bakteri asam laktat proteolitik dari bekasam. Universitas Riau. *Jurnal Natur Indonesia* **14**(2):120-125.
- Wikandari, P.R., Marsono, Y., Suparmo, dan Rahayu, E.S. (2012b). Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari bekasam sebagai penghasil angiotensin converting enzyme inhibitor pada fermentasi “bekasam-like product”. *Agritech* **32**(3):258-264.
- Yamamoto, N., Akino dan Takano. (1994). Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by extracellular proteinase of *L.helveticus* CP 790. *Journal of Dairy Science* **77**(4): 917-922.
- Yamamoto, N., Masahiro, E. dan Seiichi, M. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design* **9**(16):1345 -1355.