

LAPORAN PENELITIAN

Isolasi dan Karakteristik Molekuler Peptida *Sargassum aquifolium*



Dr. Alberta Rika Pratiwi, M.Si. (Ketua)

Dr. Ir. Ch. Retnaningsih, MP. (Anggota)

Dea Nathania Hendryanti, S.TP., M.S. (Anggota)

Bernadeta Pingkan Larasati, S.TP., M.TP. (Anggota)

**Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Katolik Soegijapranata**

2022/2023

HALAMAN PENGESAHAN

PENELITIAN INTERNAL UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA

1. Judul Penelitian : Isolasi dan Karakteristik Molekuler Peptida *Sargassum aquifolium*
2. Kode>Nama Rumpun Ilmu : Nutrisi dan Pangan Fungsional
3. Ketua Peneliti
 - a. Nama : Dr. Alberta Rika Pratiwi, M.Si
 - b. NPP : 05811993147
 - c. Jabatan Fungsional : Lektor
 - d. Program Studi : Teknologi Pangan
 - e. Nomor HP : 083865591181
4. Anggota Peneliti (1)

Nama : Dr. Ir. Ch. Retnaningsih, MP.
NPP : 05811995185
Perguruan Tinggi : Universitas Katolik Soegijapranata
5. Anggota Peneliti (2)

Nama : Dea Nathania Hendryanti, S.TP., M.S.
NPP : 05812015297
Perguruan Tinggi : Universitas Katolik Soegijapranata
6. Anggota Peneliti (3)

Nama : Bernadeta Pingkan Larasati, S.TP., M.TP.
NIM : 20.I3.0008
Perguruan Tinggi : Universitas Katolik Soegijapranata
7. Lama Penelitian : 9 bulan
8. Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp 8.000.000,00
9. Sumber Biaya : - *in cash* Dana Fakultas Rp 6.000.000,00
- *in kind* Rp 2.000.000,00

Mengetahui,
Dean Fakultas Teknologi Pertanian



Dr. Dra. Laksmi Hartajanie, M.P.
NPP 05812012281

Semarang, 6 Februari 2024
Ketua Tim Pengusul

Dr. Dra. Alberta Rika Pratiwi, M.Si
NPP 05811993147

Menyetujui,
Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat



Dr. Trihoni Ningsih Dewy, S.H., M.Hum.
NPP 05811995172

RINGKASAN

Indonesia merupakan produsen *seaweed* terbesar kedua di dunia namun sebagian besar *seaweed* diekspor dalam bentuk *seaweed* kering dikarenakan rendahnya pengembangan pengolahan *seaweed* yang menyebabkan nilai tambah yang diperoleh relatif rendah [1, 2]. Berdasarkan kandungannya *seaweed* berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber peptida yang dapat berperan sebagai peptida bioaktif [3] atau *flavor enhancer* berbasis tanaman. *Sargassum aquifolium* merupakan salah satu jenis *seaweed* coklat yang keberadaannya sangat melimpah dan tersebar luas di perairan Indonesia dengan kandungan protein dan asam amino yang tinggi [4-6]. Penelitian terhadap konsentrasi protein dan asam amino pada *edible seaweed* telah dilakukan yang menunjukkan *Sargassum aquifolium* memiliki kandungan protein dan asam glutamat yang tinggi yaitu berkisar $4,17 \pm 0,16\%$ dan $400,27 \pm 62,27$ mg/L [6]. Hal ini menunjukkan adanya potensi *Sargassum aquifolium* untuk dikembangkan menjadi bahan pangan fungsional. Perkembangan penelitian mengenai kandungan peptida bioaktif pada berbagai jenis bahan pangan sedang meningkat, termasuk *seaweed*. Namun, penelitian terkait pada *seaweed* jenis *Sargassum aquifolium* masih terbatas, sehingga perlu dilakukan identifikasi terhadap kandungan peptida yang terdapat pada *Sargassum aquifolium*. Penelitian ini juga memberikan manfaat dalam pengembangan potensi *seaweed Sargassum aquifolium* di Indonesia. Berdasarkan latar belakang tersebut maka **tujuan penelitian** ini adalah menganalisis dan mengidentifikasi peptida pada *seaweed Sargassum aquifolium*.

Untuk mencapai tujuan tersebut dilakukan penelitian yang meliputi beberapa **tahapan metode** yaitu **(1) Preparasi dan Depigmentasi *Seaweed Sargassum aquifolium*** menggunakan pelarut etanol, **(2) Ekstraksi *seaweed Sargassum aquifolium*** menggunakan pelarut air, **(3) Isolasi dan purifikasi peptida** dilakukan dengan metode Ultrafiltrasi menggunakan teknik *ultracentrifuge* dengan MWCO 3 kDa, **(4) Pengukuran berat molekul peptida** menggunakan SDS-PAGE, dan **(5) Identifikasi peptida** berdasarkan *database* UniProtKB sesuai dengan berat molekul peptida. Hasil dari penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi mengenai karakteristik molekuler peptida yang terkandung dalam *Sargassum aquifolium*. **Luaran yang ditargetkan** antara lain hasil analisis dan identifikasi peptida pada *seaweed Sargassum aquifolium* dalam penelitian ini akan dipublikasikan berupa buku (E-ISBN) mengenai Metode Ekstraksi dan Isolasi Peptida Rumput Laut yang diterbitkan oleh Universitas Katolik Soegijapranata Press. TKT dari penelitian ini adalah 2.

1. PENDAHULUAN

Seaweed merupakan jenis makroalga yang kaya kandungan protein dan asam amino. Kandungan protein pada *seaweed* berkisar 10%-40% per berat kering [7]. Budidaya *seaweed* di Indonesia berfokus pada *seaweed* sebagai sumber karagenan dan agar, padahal berdasarkan kandungannya *seaweed* berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber protein, bahan pangan fungsional [8], sumber peptida bioaktif [3], dan *flavor enhancer*. *Sargassum* sp. merupakan salah satu jenis *seaweed* coklat (*Phaeophyta*) yang keberadaannya sangat melimpah dan tersebar luas di perairan Indonesia [4, 9]. *Sargassum* sp. memiliki kandungan protein yang tinggi berkisar 11,60 – 16,30% [5, 10]. Salah satu jenis *seaweed* *Sargassum* sp. yang tumbuh di perairan Indonesia adalah *Sargassum aquifolium*. *Sargassum aquifolium* biasa dikonsumsi sebagai bahan makanan di berbagai negara termasuk di Indonesia dan dikonsumsi dalam keadaan mentah atau diolah menjadi berbagai masakan [11]. Penelitian terhadap konsentrasi protein dan asam amino pada *Sargassum aquifolium* menunjukkan *Sargassum aquifolium* memiliki kandungan protein dan asam amino *umami* yang lebih tinggi dibandingkan dengan *edible seaweed* yang lain [6]. Kandungan asam amino pada *Sargassum aquifolium* juga lebih lengkap dibandingkan *seaweed* jenis *Ulva lactuca* dan *Gracilariopsis longissima* [6].

Peptida bioaktif banyak berasal dari bahan pangan yang kaya protein seperti susu sapi, ASI, berbagai jenis ikan, telur, daging, kedelai, dan jenis kacang-kacangan [12-14]. Saat ini, identifikasi peptida dan karakteristiknya sebagai peptida bioaktif telah banyak dilakukan pada berbagai jenis *seaweed* seperti *Palmaria palmata* [15-17], *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella vulgaris*, Wakame (*Undaria pinnatifida*) [18-20], dan *Porphyra columbina* [21], *Ulva lactuca* [22], *Ecklonia cava*, *Ishige okamurae*, *Sargassum fullvelum*, *Sargassum horneri*, *Sargassum coreanum*, *Sargassum thunbergii*, *Scytosiphon lomentaria* [23], *Dunaliella salina* [24], *Chlorella vulgaris* [25], *Pyropia* sp. [26], dan *Sargassum longicruris* [27]. Tingginya kandungan protein dan asam amino pada *Sargassum aquifolium* menunjukkan adanya potensi untuk dikembangkan menjadi bahan pangan fungsional, sehingga perlu dilakukan identifikasi terhadap kandungan peptida yang terdapat pada *Sargassum aquifolium*.

Sebelumnya, identifikasi peptida dilakukan dengan menggunakan prinsip kromatografi seperti LC-MS/MS, LC-Q-TOF-MS [28], Q-TOF [29, 30], MALDI-TOF [19]. Namun, metode tersebut umumnya membutuhkan waktu yang lama dan biaya yang tinggi. Selain itu, sulit untuk mendapatkan peptida dengan kemurnian tinggi dalam campuran yang kompleks, dan

rendahnya hasil peptida yang terisolasi [31, 32], sehingga perlu adanya metode penelitian yang lebih sederhana. Dalam beberapa tahun terakhir, analisis berbasis komputer telah dilakukan untuk memprediksi dan mengidentifikasi peptida. Selain itu, metode *in silico* lebih hemat dan telah dilakukan dalam beberapa penelitian sebelumnya untuk mengidentifikasi peptida bioaktif ataupun potensi sensorik peptida [33-36].

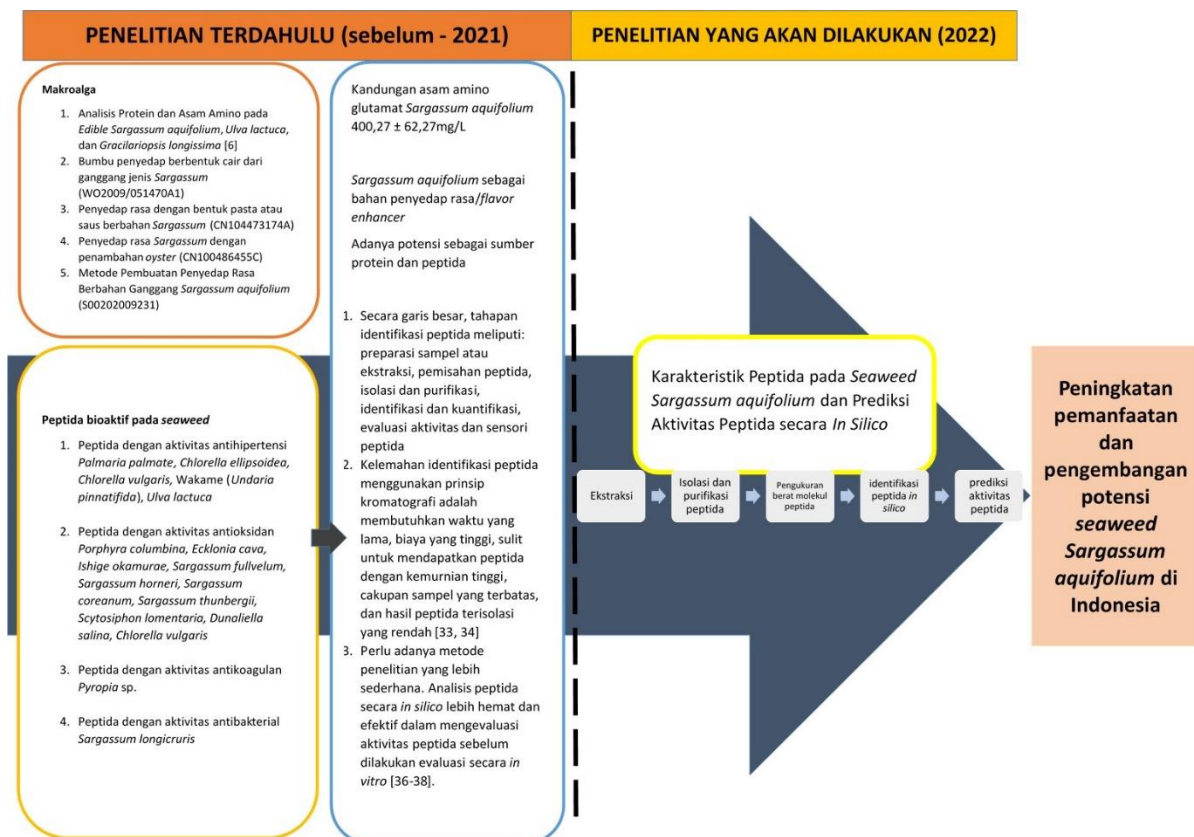
Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi karakteristik kandungan peptida pada *Sargassum aquifolium* dengan menggabungkan metode konvensional dan metode *in silico*. Hasil dari penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna untuk pengembangan lebih lanjut terkait manfaat *Sargassum aquifolium* sebagai bahan pangan fungsional dan sumber peptida yang dapat diaplikasikan sebagai agen peptida bioaktif dan penyedap rasa berbasis *seaweed Sargassum aquifolium*. Sasaran utama dari Renstra Penelitian Universitas Katolik Soegijapranata periode 2022-2024 difokuskan pada upaya-upaya: **“Peningkatan Kesejahteraan dan Kualitas Hidup Melalui Penelitian yang Adaptif dan Transformatif”**.

2. TINJUAN PUSTAKA

Seaweed merupakan makroalga yang memiliki kandungan protein lebih dari 50% berat kering dan mengandung semua jenis asam amino [37, 38] terutama asam glutamat dan asam aspartat yang merupakan komponen asam amino terbesar yang terdapat pada sebagian besar jenis *seaweed* [8] dan berkontribusi terhadap rasa *umami*. *Sargassum aquifolium* merupakan salah satu jenis *seaweed* coklat (*Phaeophyta*) yang keberadaannya sangat melimpah dan tersebar luas di perairan Indonesia [4]. Penelitian sebelumnya dilakukan analisis terhadap konsentrasi protein dan asam amino pada *Sargassum aquifolium* dan didapatkan bahwa kandungan protein *Sargassum aquifolium* lebih tinggi dibandingkan protein pada *edible seaweed Ulva lactuca* dan *Gracilariopsis longissima* sebesar $4,17 \pm 0,16\%$ dan kandungan asam amino esensial dan non-esensial yang lebih lengkap dibandingkan dengan *Ulva lactuca* dan *Gracilariopsis longissima* dengan kandungan asam glutamat sebesar $400,27 \pm 62,27$ mg/L [5, 6]. Kandungan asam glutamat pada *seaweed* coklat umumnya lebih tinggi daripada *seaweed* merah dan hijau [39, 40]. Berdasarkan kandungan asam glutamat yang tinggi dan ketersediaannya yang melimpah, maka *seaweed Sargassum aquifolium* berpotensi untuk dikembangkan menjadi bahan utama penyedap rasa [7]. Selain itu, tingginya kandungan protein pada *Sargassum aquifolium* juga memberikan potensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan pangan fungsional dan sumber peptida.

Peptida bioaktif merupakan fragmen protein spesifik yang memiliki pengaruh positif pada kondisi tubuh, sehingga dapat mempengaruhi kesehatan dengan dikonsumsi secara teratur [41]. Peptida bioaktif biasanya mengandung sekitar 3 sampai 40 asam amino dan aktivitas peptida dipengaruhi oleh komposisi dan urutan asam amino. Peptida bioaktif dapat mempengaruhi fungsi fisiologis tubuh dan berdampak dalam pengikatan reseptor spesifik dan berinteraksi pada sel target tertentu atau menghambat reaksi enzimatik [42], sedangkan untuk peptida dengan kandungan asam aspartat dan asam glutamat dapat berkontribusi terhadap pengembangan rasa *umami* [37, 43]. Penelitian mengenai kandungan peptida bioaktif pada berbagai jenis *seaweed* sudah banyak dilakukan diantaranya *Palmaria palmata* yang mengandung peptida yang dapat menghambat renin dan ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) sehingga memiliki fungsi sebagai antihipertensi dan mengandung peptida yang memiliki aktivitas antioksidan pada fraksi hidrolisat <10kDa [15-17], *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella vulgaris*, Wakame (*Undaria pinnatifida*) [18-20], *Ulva lactuca* [22] yang juga memiliki peptida dengan aktivitas antihipertensi. *Porphyra columbina* [21], *Ecklonia cava*, *Ishige okamurae*, *Sargassum fullvelum*, *Sargassum horneri*, *Sargassum coreanum*, *Sargassum*

thunbergii, *Scytosiphon lomentaria* [23], *Dunaliella salina* [24], *Chlorella vulgaris* [25] yang memiliki peptida dengan aktivitas antioksidan. *Pyropia* sp. [26] dengan aktivitas antikoagulan, *Sargassum longicruris* sebagai antibakterial [27]. Perkembangan mengenai identifikasi karakteristik dan aktivitas peptida pada *seaweed* membuat peneliti ingin menganalisis dan memprediksi komponen peptida yang terdapat pada *seaweed* terutama jenis *Sargassum aquifolium* dengan pendekatan metode konvensional dan *in silico*. Teridentifikasinya karakteristik peptida dapat memberikan manfaat dalam peningkatan pemanfaatan dan pengembangan potensi *seaweed Sargassum aquifolium* di Indonesia.



Gambar 1. Road Map Penelitian

Tahapan yang dilakukan dalam isolasi dan identifikasi peptida secara garis besar terdiri dari proses ekstraksi, isolasi dan purifikasi peptida, kemudian dilanjutkan dengan identifikasi peptida [3, 37]. Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut air dengan metode *Ultrasound* yang bertujuan menimbulkan *osmotic shock* pada komponen peptida [44-46]. Setelah itu dilakukan pemisahan peptida menggunakan membran ultrafiltrasi (UF) dengan metode *ultracentrifuge*, kemudian dilanjutkan dengan analisis berat molekul peptida menggunakan SDS-PAGE yang kemudian diidentifikasi berdasarkan database UniProtKB sesuai dengan berat molekul peptida.

3. METODOLOGI

3.1. Preparasi dan Depigmentasi *Seaweed Sargassum aquifolium*

Seaweed Sargassum aquifolium kering didapatkan dari pengepul Pantai Sayang Heulang Garut, Jawa Barat dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 24 jam. *Seaweed* kering dihaluskan dan diayak dengan *mesh* 20 dan 80, kemudian dihilangkan pigmen warnanya menggunakan *food grade* etanol 96% dengan rasio 1:10 (w/v) [47] dengan modifikasi. Terdapat dua macam perlakuan dalam penelitian pendahuluan ini yaitu proses depigmentasi pada *seaweed* dengan perbedaan ukuran *mesh* (20 dan 80) dengan periode waktu pergantian etanol seminggu sekali selama 4 minggu dan depigmentasi *seaweed mesh* 80 dengan perbedaan periode waktu pergantian etanol. Perlakuan depigmentasi dilakukan pada suhu 25°C dengan pengadukan konstan 250 rpm.

3.2. Analisa Perubahan Warna pada *Seaweed Sargassum aquifolium*

Seaweed kering sebelum dan sesudah proses depigmentasi dianalisa warnanya menggunakan *Chromameter*. Sebelum pengukuran warna, masing-masing sampel *seaweed* kering dihaluskan dan diayak dengan ukuran *mesh* 80 agar ukuran partikel sampel lebih homogen. Setelah itu, *chromameter* dikalibrasi terlebih dahulu kemudian *seaweed* diletakkan pada tempat pengukuran sampel dan diukur nilai L (*lightness*). Perlakuan depigmentasi pada *seaweed* yang menghasilkan nilai L (*lightness*) tertinggi digunakan sebagai sampel *seaweed* dalam penelitian ini.

3.3. Ekstraksi Peptida *Seaweed Sargassum aquifolium*

Biomassa kering *seaweed Sargassum aquifolium* dihaluskan menggunakan blender dan dilarutkan dengan *aquades* perbandingan 1:20 (w/v), lalu diekstraksi menggunakan metode *reflux* dan *ultrasound assisted extraction* [47, 48] dengan pelarut air. Metode *reflux* dilakukan dengan dipanaskan pada suhu 100°C selama 20 menit dengan pengadukan konstan 250 rpm, sedangkan metode *ultrasound assisted extraction* dilakukan pada suhu 30°C, frekuensi 53 kHz, daya amplitudo 70%, dan *cycle* 0,5 selama 30 menit. Supernatan hasil dari ekstraksi *reflux* dan *ultrasound* masing-masing endapannya dipisahkan dengan sentrifugasi 5.000 rpm selama 20 menit. Setelah itu dilakukan pre-filtrasi dengan membran filter 0,45 µm dan didapatkan ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium*.

3.4. Pemisahan Peptida dengan Ultrafiltrasi (UF)

Ekstrak *Sargassum aquifolium* dipisahkan melalui sistem ultrafiltrasi dengan ukuran batas membran 10.000 Da [49-52]. Pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi kecepatan 5.000 rpm menggunakan *fixed rotor* pada suhu 4°C selama 30 menit. Fraksi A1 adalah berat molekul <10.000 Da dan fraksi A2 dengan berat molekul >10.000 Da. Fraksi A1 kemudian dilakukan pengukuran berat molekul peptida penyusunnya.

3.5. Analisa Protein dengan Metode Lowry

Analisa protein menggunakan metode Lowry [53] dengan modifikasi. Analisa dilakukan pada sampel *seaweed* kering sebelum proses depigmentasi, *seaweed* kering setelah proses depigmentasi (setelah minggu ke-5 untuk *seaweed* dengan periode pergantian etanol seminggu sekali dan hari ke-1, 3, dan 5 untuk *seaweed* dengan periode pergantian etanol setiap hari), filtrat hasil ekstraksi *reflux* dan *ultrasound*, serta filtrat <10.000 Da dari pemisahan ultrafiltrasi setelah proses ekstraksi *reflux* dan *ultrasound*. Sebelum dilakukan analisa protein, sampel *seaweed* kering dan sampel *seaweed* setelah depigmentasi diekstrak dengan garam/alkalin karena sampel berupa padatan. Sampel sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 30 mL 0,1 M NaOH dalam 3,5% NaCl kemudian diinkubasi selama 2 jam. Setelah itu, larutan disaring dengan kertas saring dan filtratnya digunakan untuk analisa protein.

Filtrat sampel sebanyak 0,5 mL dilarutkan dengan *aquades* sampai volume total 4 mL kemudian ditambahkan dengan 5,5 mL larutan (3) yang merupakan campuran larutan (1) dan (2) yaitu larutan Na₂CO₃ 2% dalam larutan NaOH 0,1 N (1) dan larutan campuran CuSO₄ 0,5% dalam larutan KNaC₄H₄O₆.4H₂O 1% (2). Setelah itu, larutan divortex dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian, larutan ditambahkan dengan larutan folin (1:10) sebanyak 0,5 mL kemudian divortex dan didiamkan selama 30 menit. Larutan kemudian dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS panjang gelombang 650 nm. Kurva standar menggunakan BSA (*Bovine Serum Albumine*) dengan konsentrasi 0; 2,344; 4,688; 9,375; 18,750; 37,500; 75; 150; 300; 600 ppm dan dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 650 nm.

3.6. Pengukuran Berat Molekul Peptida dengan SDS-PAGE

Identifikasi peptida berdasarkan berat molekulnya diawali dengan menganalisis berat molekul peptida dari fraksi A1 menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dan *Tricine Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) [54, 55]. Dalam penelitian ini menggunakan marker protein

Precision Plus Protein Dual Xtra Standards 2.000-250.000 Da dan *Ultra Low Range Molecular Weight Marker* 1.060-26.600 Da, kemudian menggunakan *precast gel* TGN (*Tris Glycine Novel*) 4-15% dan *precast gel Tris-Tricine* 16,5%. Perbandingan sampel dengan *buffer* sampel *tricine* 1:2 yang kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 15 menit. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak 20µL/sumur. *Running* sampel dilakukan dalam beberapa kondisi hingga menghasilkan pemisahan berat molekul peptida dengan pita peptida terbaik. Setelah proses pemisahan berat peptida, dilanjutkan dengan proses pewarnaan *Coomassie blue*. Proses pewarnaan *Coomassie blue* dilakukan dengan inkubasi gel di dalam 0,025% pewarna *Coomassie* dalam 10% asam asetat, kemudian dilakukan penghilangan warna dengan diinkubasi dalam asetat glasial 5% dalam metanol. Setelah itu dilakukan pengukuran pada pita protein dari hasil *Tricine*-SDS-PAGE.

3.6.1. Pengukuran Berat Molekul Peptida

Setelah didapatkan pita protein dari hasil *Tricine*-SDS-PAGE kemudian dilakukan pengukuran terhadap berat molekul peptida. Pengukuran berat molekul (BM) dihitung dengan mencari nilai Retardation Factor (Rf) dari pita protein dengan rumus berikut.

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari posisi awal}}{\text{Jarak panjang gel dari posisi awal}}$$

Setelah Rf diketahui, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier dengan rumus sebagai berikut.

$$y = ax^2 + bx + c$$

Keterangan:

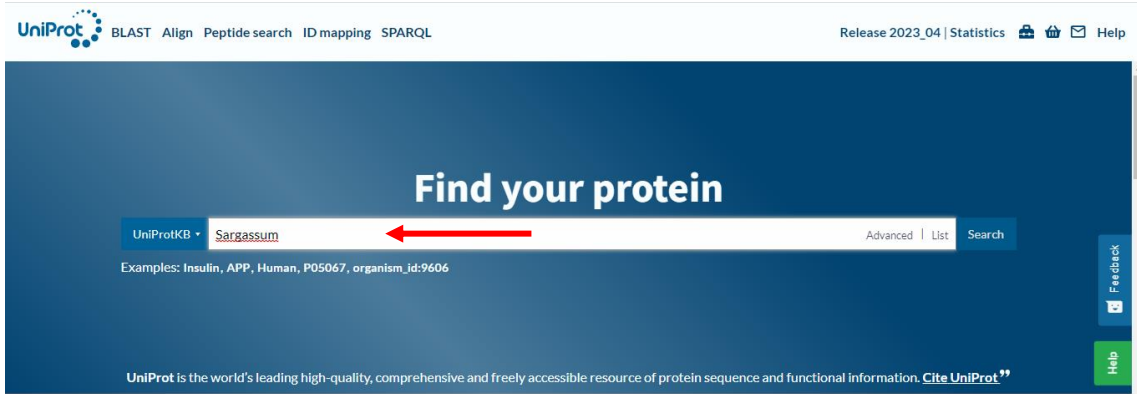
y = log BM

x = Rf

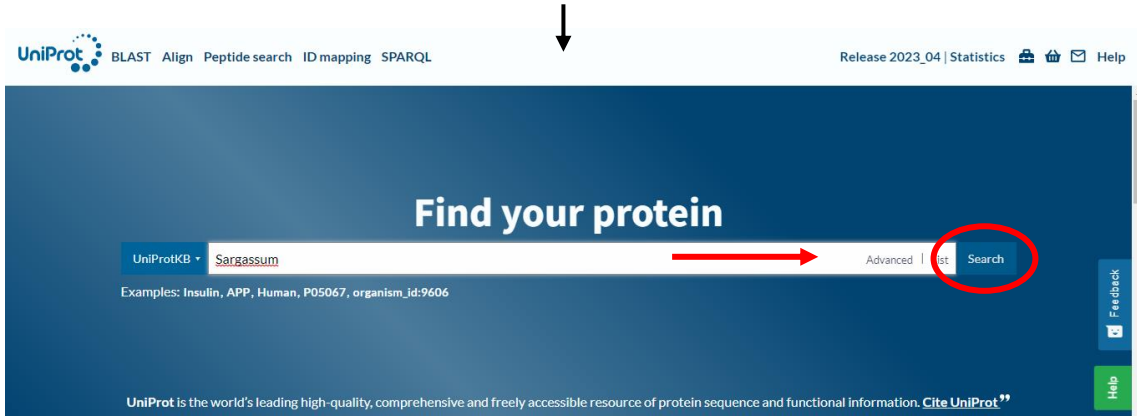
BM = anti log y

3.7. Identifikasi Peptida Berdasarkan Berat Molekul Peptida

Identifikasi profil peptida berdasarkan berat molekulnya dilakukan berdasarkan *database* UniProtKB melalui <https://www.uniprot.org> [33], sehingga diketahui urutan rantai peptida (*sequence*). Alur analisa identifikasi peptida berdasarkan *database* UniProtKB dapat dilihat pada Gambar 2.



pada menu “Search” ditulis spesies organisme yang ingin dicari yaitu *Sargassum* atau *Sargassum aquifolium*



kemudian klik “Search”

UniProt BLAST Align Peptide search ID mapping SPARQL UniProtKB Advanced | List Search Help

UniProtKB 7,199 results

or search "Sargassum" as a Organism, Taxonomy, or Strain

BLAST Align Map IDs Download Add View: Cards Table Customize columns Share

Entry	Entry Name	Protein Names	Gene Names	Organism	Length	Mass	Sequence	Fragment
<input type="checkbox"/> A0A3G2GQ15	A0A3G2GQ15_9PHAE	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit		Sargassum sp	8 AA	955 Da	MRLTQGCF	Fragment
<input type="checkbox"/> A0A3G2GQ04	A0A3G2GQ04_9PHAE	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit		Sargassum cf. granuliferum	8 AA	955 Da	MRLTQGCF	Fragment
<input type="checkbox"/> J7FJU4	J7FJU4_9PHAE	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	rbcL	Carpophyllum plumosum	10 AA	1,064 Da	DFVEVPTGSM	Fragment
<input type="checkbox"/> A0A6G9HEU1	A0A6G9HEU1_9PHAE	ATP synthase FO subunit 9	atp9	Sargassum horneri	11 AA	1,114 Da	MLVQAARKLLG	Fragment

diketahui urutan rantai peptida (*sequence*) dan berat molekul peptida (Da)

Gambar 2. Alur analisa profil peptida pada *database* UniProtKB

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Analisa Perubahan Warna *Seaweed Sargassum aquifolium* pada Proses Depigmentasi

Sargassum aquifolium hasil dari proses depigmentasi menunjukkan perubahan warna terutama pada nilai L (*lightness*). Warna coklat pada *seaweed Sargassum aquifolium* merupakan kandungan pigmen seperti klorofil a dan c, fukosantin, beta karoten, dan violasantin [56]. Proses depigmentasi dilakukan dengan menggunakan pelarut organik etanol, dikarenakan pelarut etanol mampu melarutkan pigmen lebih baik dibandingkan pelarut organik yang lain seperti metanol dan kloroform [47]. Pada Tabel 1. menunjukkan perubahan warna pada *seaweed* dengan perlakuan periode waktu pergantian etanol seminggu sekali pada ukuran *mesh* yang berbeda.

Tabel 1. Perubahan Nilai L (*lightness*) pada *seaweed* dengan Ukuran Partikel Berbeda

Periode Pergantian Etanol (Minggu)	Ukuran Partikel <i>Seaweed</i>	
	<i>Mesh</i> 20	<i>Mesh</i> 80
0	48,59	48,59
1	50,83	56,91
2	53,17	59,46
3	52,32	56,59
4	51,16	52,37

Proses depigmentasi pada *seaweed mesh* 80 menghasilkan nilai *lightness* yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai *lightness* pada *seaweed* dengan *mesh* 20. Semakin kecil ukuran partikel *seaweed* maka semakin tinggi nilai *lightness* yang menunjukkan semakin cerah warna *seaweed* yang dihasilkan. Ukuran partikel yang semakin kecil memiliki kemampuan memperluas permukaan partikel yang dapat mempercepat proses penetrasi pelarut ke bagian dalam partikel bahan [57].

Perubahan warna pada nilai L (*lightness*) selama proses depigmentasi dengan periode waktu pergantian etanol yang berbeda yaitu seminggu sekali dan setiap hari dapat dilihat pada Tabel 2. Perbedaan periode pergantian etanol menunjukkan bahwa periode waktu pergantian etanol setiap hari menghasilkan nilai *lightness* yang lebih tinggi dibandingkan periode pergantian etanol per minggu. Pergantian etanol setiap hari memungkinkan kemampuan pelarut etanol lebih optimal dalam mengekstrak pigmen dari matriks *seaweed* dikarenakan adanya pembaruan kualitas dari pelarut etanol. Pergantian pelarut etanol setiap minggu memungkinkan terjadinya

kejenuhan pada pelarut, sehingga kemampuannya dalam melarutkan komponen pigmen menjadi terbatas dan tidak maksimal. Hal ini dinyatakan oleh [58], bahwa kemampuan etanol dalam melarutkan senyawa menurun akibat terjadinya kejenuhan setelah melewati waktu optimumnya. Dari beberapa kondisi proses depigmentasi, depigmentasi dengan ukuran *seaweed mesh* 80 dengan pergantian etanol setiap hari selama 3 hari (72 jam) memberikan hasil depigmentasi dengan nilai L (*lightness*) tertinggi dibandingkan dengan kondisi depigmentasi yang lainnya, sehingga metode depigmentasi ini yang digunakan dalam penelitian utama.

Tabel 2. Perubahan Nilai L (*lightness*) pada *Seaweed* dengan Periode Waktu Pergantian Etanol Berbeda

Periode Pergantian Etanol	Ukuran Partikel <i>Seaweed Mesh</i> 80	
	Minggu	Hari
0	48,59	48,59
1	56,91	57,27
2	59,46	61,60
3	56,59	62,92
4	52,37	57,34
5	51,95	55,78

4.2. Analisa Kandungan Protein *Seaweed Sargassum aquifolium*

Analisa kandungan protein *seaweed Sargassum aquifolium* dilakukan pada *seaweed* kering tanpa perlakuan, *seaweed* setelah proses depigmentasi, dan hasil WSE *reflux* dan *ultrasound* yang dapat dilihat pada Tabel 3. Terjadi penurunan kandungan protein *seaweed* sebelum dan sesudah proses depigmentasi. Penurunan protein setelah proses depigmentasi disebabkan oleh larutnya sebagian kandungan asam amino ke dalam pelarut organik etanol. Dalam penelitian sebelumnya [59], pengaruh etanol terhadap kelarutan asam amino menyatakan bahwa kelarutan asam amino menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi etanol pada kondisi suhu yang konstan. Selain itu, kelarutan asam amino dalam etanol murni secara signifikan jauh lebih rendah dibandingkan dengan kelarutan asam amino dalam air murni.

Dalam penelitian sebelumnya [59] juga menyatakan asam amino DL-alanin, glisin, dan valin dalam pelarut etanol konsentrasi 96% pada suhu 25°C memiliki kelarutan yang rendah. Selain itu, asam amino DL-serin juga memiliki kelarutan yang sangat rendah dimulai dari konsentrasi etanol 92% ke atas bahkan mencapai 0 atau tidak larut. Kelarutan asam amino leusin cenderung stabil dalam pelarut etanol dengan konsentrasi % tinggi maupun rendah pada suhu 25°C sebesar kurang dari 0,01 fraksi mol. Dalam penelitian ini proses depigmentasi dilakukan dalam kondisi

suhu konstan 25°C dan konsentrasi etanol yang digunakan sebesar 95% yang artinya bukan etanol murni, sehingga adanya kemungkinan sebagian kecil asam amino yang larut ke dalam pelarut etanol. Proses maserasi dan pengendapan dengan etanol dapat digunakan untuk mereduksi kandungan garam dan meningkatkan konsentrasi asam amino bebas, serta menghilangkan kandungan peptida hidrofobik dan asam amino pahit seperti fenilalanin (F) dan tirosin (Y) [60].

Tabel 3. Kandungan Protein pada *Seaweed Sargassum aquifolium*

<i>Seaweed Sargassum aquifolium</i>	Perlakuan	Kandungan Protein (mg/100 g)
Padatan 80 mesh	Tanpa perlakuan	890,9748 ± 31,04
Padatan 80 mesh	Depigmentasi 72 jam	740,4925 ± 12,51
Ekstrak <i>Reflux</i>	WSE <i>Reflux</i>	332,6239 ± 10,73
Ekstrak <i>Reflux</i> MW <10.000 Da	Ultrafiltrasi	415,3419 ± 0,392
Ekstrak <i>Ultrasound</i>	WSE <i>Ultrasound</i>	305,1026 ± 9,963
Ekstrak <i>Ultrasound</i> MW <10.000 Da	Ultrafiltrasi	358,2479 ± 0,267

Keterangan: Nilai pada tabel merupakan hasil nilai rata-rata ± standar deviasi dari tiga pengulangan

Metode analisa Lowry merupakan kombinasi dari metode Biuret dimana ion tembaga bereaksi dengan ikatan peptida dalam protein dan reaksi antara reagen Folin-Ciocalteu dengan struktur cincin pada asam amino aromatik yang ditunjukkan oleh terbentuknya warna biru [53]. Dalam analisa Lowry, intensitas warna yang terbentuk bergantung pada ukuran protein dan komposisi asam amino. Pembentukan warna meningkat seiring dengan ukuran peptida yang sebanding dengan jumlah ikatan peptida yang terdapat dalam larutan yang menunjukkan semakin panjang ikatan peptida, maka semakin pekat intensitas warna yang terbentuk [61, 62]. Oleh karena itu, peptida dengan ukuran yang kecil menghasilkan jumlah warna (intensitas warna) yang rendah. Hal serupa juga terjadi pada penelitian sebelumnya dimana analisa kandungan total protein dengan metode Lowry menghasilkan intensitas warna yang rendah dalam menganalisa kandungan peptida dengan rantai pendek dan asam amino dengan berat molekul yang kecil [63]. Selain itu, diketahui bahwa analisa protein dengan berat molekul diatas 40.000 sampai 50.000 Da juga tidak menghasilkan respon intensitas warna yang baik. Namun, untuk peptida dengan berat molekul yang lebih kecil memberikan intensitas warna yang lebih rendah dibandingkan dengan berat molekul yang lebih besar [62, 64].

4.3. Analisa Hasil Pengukuran Berat Molekul Peptida

Pengukuran berat molekul peptida dalam penelitian ini menggunakan metode *Tricine Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan beberapa kondisi pemisahan yang dapat dilihat pada Tabel 4. Percobaan kondisi 1 dan 2 menggunakan 8 kolom dengan urutan dari kiri ke kanan yaitu kolom 1 dan 8 merupakan *Ultra Low Range Molecular Weight Marker* 1.060 – 26.600 Da (SIGMA), kemudian kolom 2 sampai 6 merupakan ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium*. Percobaan kondisi 3 dilakukan untuk mengetahui kondisi *running* SDS-PAGE yang dapat memisahkan marker protein (kolom 1 dan 2), sehingga dalam percobaan kondisi 3 ini tidak dilakukan dengan sampel. Hasil SDS-PAGE pada percobaan kondisi 1 dan 2 dapat memisahkan 2 sampai 3 marker protein dari 6 berat molekul marker dan peptida pada ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* tidak terdeteksi. Pada percobaan kondisi 3, marker protein 26.600 Da sampai 6.500 Da (kolom 2) berhasil terpisah sebagian yaitu 4 pita dari total 6 berat molekul marker. Dari hasil SDS-PAGE yang terdapat pada Tabel 4 menunjukkan belum adanya metode pemisahan berat molekul peptida yang tepat dalam menghasilkan pita peptida dari sampel ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium*.

Ketidakberhasilan dalam proses pemisahan berat molekul peptida dalam penelitian ini dapat disebabkan oleh ketidakcocokan kondisi SDS-PAGE yang digunakan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi hasil dari pemisahan SDS-PAGE antara lain jenis bahan dan formulasi dari *separating* gel dan *stacking* gel, jenis *buffer* sampel, proses pewarnaan dan *destaining*, serta kondisi *running* sampel. Kondisi gel yang digunakan merupakan TGN (*Tris Glycine Novel*) dengan konsentrasi gel 4-15%. Migrasi protein pada konsentrasi gel berkisar antara 11 hingga 18% tidak dapat menghasilkan resolusi yang baik pada berat molekul dibawah ~6.000 Da. Namun, penggunaan gel *polyacrylamide* konsentrasi 18% dengan urea 3 gram pada *separation* gel dapat memisahkan peptida hingga 600 Da [65, 66].

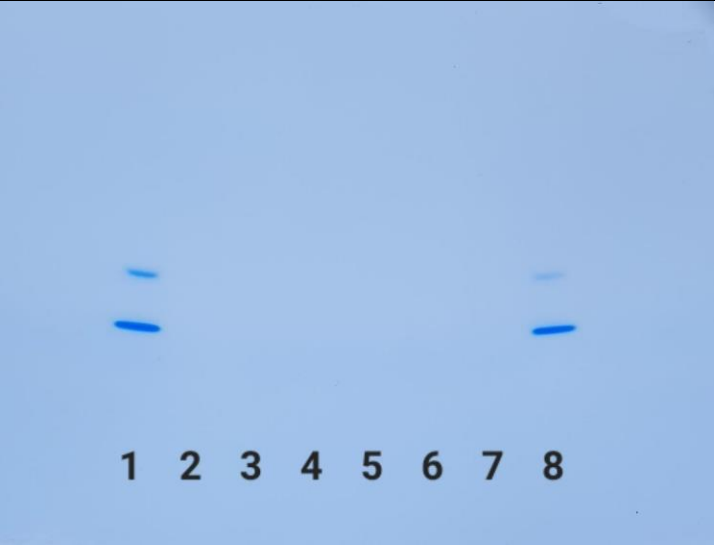
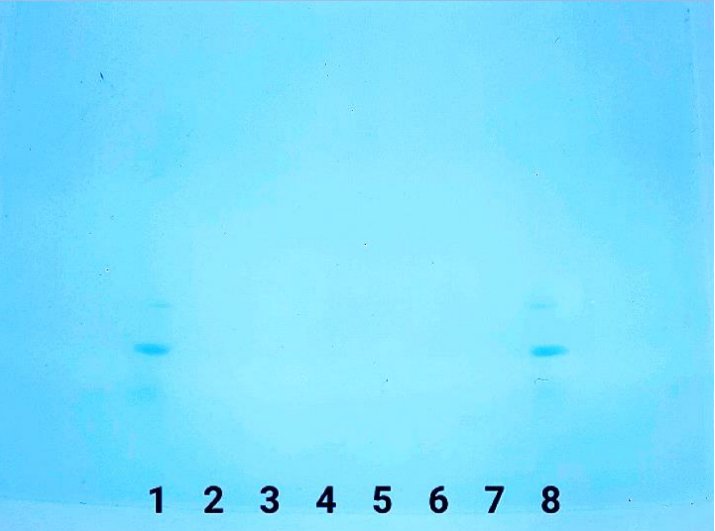
Kondisi selama elektroforesis juga sangat mempengaruhi hasil dari SDS-PAGE. Pada Tabel 4 dapat dilihat bahwa proses elektroforesis dengan tegangan (V) dan arus (mA) listrik yang lebih kecil dapat memisahkan berat molekul peptida dengan ukuran yang kecil lebih baik (percobaan kondisi 3 dan 4) dibandingkan tegangan (V) dan arus (mA) listrik yang lebih besar. Tegangan pada proses elektroforesis berpengaruh terhadap kecepatan perpindahan molekul peptida, sehingga semakin kecil tegangan maka semakin lambat pula perpindahan peptida selama proses elektroforesis. Peptida dengan ukuran molekul yang kecil diperlukan perpindahan yang lambat agar peptida dapat terpisah dengan optimal dan tidak hilang selama proses

elektroforesis. Penentuan tegangan dan arus listrik selama proses elektroforesis juga dipengaruhi oleh ukuran dimensi gel, ketebalan gel, dan konsentrasi *acrylamide* pada gel [54].

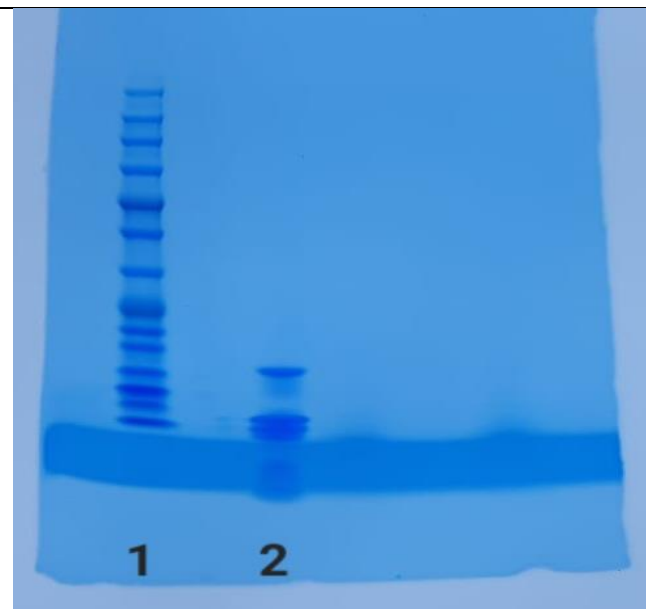
Selain konsentrasi gel, jenis bahan penyusun gel juga berpengaruh dalam pemisahan berat molekul dari proses SDS-PAGE. Penggunaan gel berbahan *glycine* diketahui dapat memisahkan secara optimal peptida/protein dengan berat molekul >30.000 Da. Dalam penelitian ini, ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* yang dijadikan sebagai sampel memiliki berat molekul kurang dari 10.000 Da yang merupakan supernatant hasil ultrafiltrasi membran 10.000 Da. Jenis gel *tricine* diketahui dapat secara optimal memisahkan peptida dengan berat molekul <30.000 Da terutama peptida dengan berat molekul 1 sampai 20.000 Da [55]. Konsentrasi 10% pada gel *spacer* diantara 4% *stacking* gel dan 16% *separating* gel dapat menghasilkan pita protein dan peptida lebih jelas pada skala berat molekul 1 sampai 5.000 Da. *Tricine*-SDS-PAGE memiliki konsentrasi *acrylamide* yang rendah. Hal ini dapat mendukung *blotting* dan pewarnaan protein, serta mengurangi hilangnya protein selama proses elektroforesis [54, 67].

Penggunaan *Tricine*-SDS-PAGE terbukti berhasil memisahkan pita peptida pada ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* <10.000 Da pada percobaan kondisi 4. Kolom 1 sampai 3 merupakan ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* WSE *reflux* dan kolom 4 sampai 6 merupakan ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* WSE *ultrasound*, sedangkan kolom 7 merupakan marker protein 1 *Ultra Low Range Molecular Weight Marker* 1.060-26.600 Da (SIGMA) dan kolom 8 merupakan marker protein 2 *Precision Plus Protein Dual Xtra Standards* 2.000-250.000 Da (BioRad). Secara keseluruhan, pita peptida yang teridentifikasi pada percobaan kondisi 4 memiliki ketebalan yang rendah dibandingkan dengan ketebalan pita pada marker peptida. Hal ini dikarenakan ketebalan peptida yang terbentuk menunjukkan banyaknya peptida yang memiliki berat molekul yang sama, sehingga apabila terbentuk pita yang tebal berarti terdapat akumulasi molekul dan ukuran peptida yang sama pada pita yang sama atau berdekatan begitu pula sebaliknya [68]. Selain itu, adanya kemungkinan peptida yang keluar dari gel (*diffusing out*) saat proses pewarnaan dan *destaining*. Keberadaan pita peptida ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* berada dibawah marker protein 2 yaitu 2.000 Da, sehingga dapat dipastikan berat molekul dari pita peptida terdeteksi <2.000 Da. Berdasarkan hasil perhitungan didapatkan berat molekul peptida hasil WSE *reflux* antara lain sebesar 673 Da, 797 Da, dan 1.019 Da, sedangkan peptida hasil WSE *ultrasound* antara lain sebesar 1.408 Da, 1.195 Da, dan 1.019 Da.

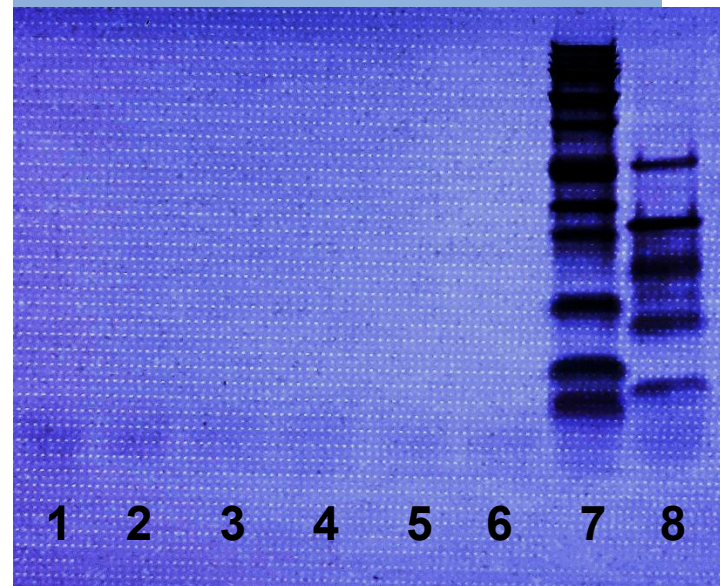
Tabel 4. Kondisi Pemisahan Berat Molekul Peptida menggunakan Metode SDS-PAGE

No.	Kondisi SDS-PAGE		Hasil SDS-PAGE
1	Jenis gel	TGN (<i>Tris Glycine Novel</i>) 4-15%; 12 sumur (10 x 8,3 cm); ketebalan gel 1 mm	
	<i>Buffer sampel</i>	Laemmli : β -mercaptoethanol (19:1)	
	<i>Kondisi running</i>	250 V; awal 80 mA, akhir 35 mA; selama 25 menit	
	Proses pewarnaan dan <i>destain</i>	Pewarnaan <i>Coomassie blue</i> selama 120 menit dan <i>destain</i> selama 45 menit	
2	Jenis gel	TGN (<i>Tris Glycine Novel</i>) 4-15%; 12 sumur (10 x 8,3 cm); ketebalan gel 1 mm	
	<i>Buffer sampel</i>	Abbkine SDS-PAGE <i>sample loading buffer</i> 5x	
	<i>Kondisi running</i>	100 V; awal 50 mA, akhir 35 mA; selama 90 menit	
	Proses pewarnaan dan <i>destain</i>	Pewarnaan <i>Coomassie blue</i> selama 60 menit dan <i>destain</i> selama 60 menit	

3 Jenis gel TGN (*Tris Glycine Novel*) 4-15%; 12 sumur (10 x 8,3 cm); ketebalan gel 1 mm
Buffer sampel -
Kondisi running 100 V; awal 30 mA, akhir 30 mA; selama 110 menit
Proses pewarnaan dan destain Pewarnaan *Coomassie blue* selama 180 menit dan *destain* selama 30 menit



4 Jenis gel *Tris-Tricine* 16,5%; 10 sumur; ketebalan 1 mm
Buffer sampel 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% gliserol, 2% SDS, 0,04% *Coomassie blue*, β -mercaptoethanol
Kondisi running 100 V; awal 50 mA, akhir 50 mA; selama 240 menit
Proses pewarnaan dan destain Pewarnaan *Coomassie blue* selama *overnight* dan *destain* selama 5 menit



4.4. Identifikasi Peptida Berdasarkan Berat Molekul Peptida

Identifikasi profil peptida hasil pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE dilakukan berdasarkan *database* UniProtKB. *Database* UniProt telah banyak digunakan dalam berbagai bidang penelitian biomedis secara luas seperti menggunakan anotasi UniProt sebagai sumber data atau *sequence*, mengintegrasikan data dari UniProt, untuk mengidentifikasi protein, anotasi fungsional, dan studi komparatif [69]. Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi terhadap rantai peptida (*sequence*) dengan mengintegrasikan data berat molekul peptida dari *database* UniProtKB. Profil peptida ditentukan dari berat molekul yang didapatkan dari hasil pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE yang paling mendekati dengan berat molekul pada *database* UniProtKB genus *Sargassum* sp. yang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Profil Peptida Ekstrak *Seaweed Sargassum aquifolium* Berdasarkan *Database* UniProtKB

Metode WSE	Ulangan	Berat Molekul (Da)	Jenis Peptida *	Rantai Peptida
<i>Reflux</i>	1	673	-	-
	2	797	-	-
	3	1.019	<i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	DFVEVPTGSN
<i>Ultrasound</i>	1	1.408	<i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	DTPDFVEVATESP
	2	1.019	<i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	DFVEVPTGSN
	3	1.195	<i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit</i>	MRLTQGCFSF

Keterangan:

Alanin (A), Sisteina (C), Asam Aspartat (D), Asam Glutamat (E), Fenilalanin (F), Glisina (G), Histidina (H), Isoleusina (I), Lisina (K), Leusina (L), Metionina (M), Asparagina (N), Prolina (P), Glutamina (Q), Arginina (R), Serina (S), Treonina (T), Valina (V), Triptofan (W), Tirosina (Y)

*) Jenis peptida ditentukan dari berat molekul peptida hasil pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE yang mendekati dengan berat molekul pada *database* UniProtKB

Susunan rantai peptida (*sequence*) yang diperoleh dari kedua hasil ekstrak *seaweed* WSE *reflux* dan *ultrasound* antara lain DFVEVPTGSN (1.019 Da), DTPDFVEVATESP (1.408 Da), dan MRLTQGCFSF (1.195 Da). Peptida dengan berat molekul 1.109 Da diprediksi memiliki rantai

peptida DFVEVPTGSN dari *database* UniProtKB dengan berat molekul 1.064 Da yang paling mendekati berat molekul peptida hasil pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE. Rantai peptida DFVEVPTGSN dimiliki oleh organisme *Carpophyllum plumosum* yang merupakan spesies *seaweed* cokelat dengan nama asli (*original name*) *Sargassum plumosum* A. Richard, 1832 [70], sehingga *Carpophyllum plumosum* termasuk dalam genus *Sargassum* sp. dalam pencarian di *database* UniProtKB. Peptida dengan berat molekul 1.408 Da diprediksi memiliki rantai peptida DTPDFVEVATESP yang dari *database* UniProtKB memiliki berat molekul 1.406 Da. Rantai peptida DTPDFVEVATESP dimiliki oleh organisme *Sargassum thunbergii* yang termasuk dalam genus *Sargassum* sp. dengan nama *Sargassum thunbergii* (Mertens ex Roth) Kuntze, 1880 dan memiliki induk (*parent*) *Sargassum* C. Agardh, 1820 [71]. Lalu, untuk peptida dengan berat molekul 1.195 Da diprediksi memiliki rantai peptida MRLTQGCFSF yang dalam *database* UniProtKB memiliki berat molekul 1.189 Da. Rantai peptida MRLTQGCFSF dimiliki oleh organisme *Sargassum ilicifolium* yang termasuk dalam genus *Sargassum* sp. dan memiliki nama lain *Sargassum ilicifolium* (Turner) C. Agardh, 1820 [72].

Berdasarkan analisa *in silico* dengan *database* UniProtKB, berat molekul peptida yang teridentifikasi pada ekstrak *seaweed* WSE *reflux* dan *ultrasound* merupakan *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* dengan subunit besar dan kecil (Tabel 5). *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* lebih dikenal dengan RuBisCO merupakan enzim metabolisme yang berperan dalam fiksasi karbon dioksida dalam siklus Calvin dan fotorespirasi, bergantung pada afinitasnya terhadap karbon dioksida atau oksigen [73]. RuBisCO terdapat pada organisme autotropik termasuk alga (mikroalga dan makroalga), bakteri (bakteri fotosintetik dan bakteri *chemoautotrophic*), *cyanobacteria*, dan tanaman [73]. Peran utamanya adalah konversi karbon dioksida dari biosfer menjadi senyawa organik dalam laju siklus Calvin [74]. RuBisCO dimanfaatkan sebagai sumber peptida bioaktif sebagai antihipertensi, antibakterial, dan antioksidatif [73]. Dalam penelitian sebelumnya telah dilakukan analisa aktivitas bioaktif RuBisCO subunit besar dari *edible seaweed* secara *in silico* menggunakan *database* BIOPEP dan diketahui bahwa peptida RuBisCO dari *seaweed* dapat menjadi komponen menjanjikan untuk pengembangan DPP-IV, penghambat ACE, dan aktivitas antioksidan [75].

Rantai peptida dengan lebih dari 7 residu asam amino memiliki keragaman profil rasa karena kompleksitas dan ketidakhomogenan komposisi dari asam amino. Residu asam amino alanin (A), Serina (S), dan aspartat (D) yang berada pada posisi N-terminal ditemukan pada banyak

peptida rantai panjang yang memiliki rasa *umami* dengan frekuensi penemuannya lebih dari 10% [76]. Hal ini menunjukkan bahwa adanya kemungkinan rantai peptida teridentifikasi DFVEVPTGSN dan DTPDFVEVATESP memiliki potensi rasa *umami* karena adanya asam amino aspartat (D) yang berada pada N-terminal.

Rantai peptida DFVEVPTGSN dan DTPDFVEVATESP juga memiliki komposisi asam amino aspartat (D), glutamat (E), glisin (G), dan Alanin (A) yang diketahui memiliki kontribusi sebagai asam amino pembentuk cita rasa lezat terutama asam glutamat (E). Asam amino aspartat (D) dan glutamat (E) merupakan residu asam amino aktif yang dominan dan keberadaannya memberikan kontribusi terhadap rasa *umami*. Asam amino bentuk garam dan ionik dari asam amino aspartat (D) dan glutamat (E) berkontribusi terhadap rasa *umami* pada *seaweed* [77, 78]. Hal ini juga membuktikan bahwa penambahan air dalam proses ekstraksi peptida *seaweed* dapat menimbulkan *osmotic shock* pada *seaweed* sehingga asam amino *umami* (glutamat dan aspartat) yang merupakan komponen hidrofilik dapat larut dalam pelarut air selama proses ekstraksi [28, 44]. Selain itu, *Sargassum aquifolium* termasuk dalam *seaweed* cokelat yang diketahui memiliki kandungan protein, asam glutamat (E), dan asam aspartat (D) yang lebih tinggi dibandingkan dengan *seaweed* merah yang memiliki kandungan asam amino yang rendah [43]. Dilihat dari komposisi asam amino dan keberadaan asam aspartat (D) pada posisi N-terminal menjadikan adanya kemungkinan peptida DFVEVPTGSN dan DTPDFVEVATESP memiliki potensi sebagai *taste-active* peptida *umami*.

Terdapat 2 peptida yang tidak teridentifikasi profil peptidanya berdasarkan *database* UniProtKB yaitu peptida dengan berat molekul 673 Da dan 797 Da yang keduanya merupakan hasil dari WSE *reflux*. Berdasarkan *database* UniProtKB, ukuran berat molekul peptida terkecil yang terdapat pada genus *Sargassum* sp. dan *Sargassum aquifolium* adalah 955 Da dan berat molekul tersebut sangat tidak mendekati dengan berat molekul peptida teridentifikasi. Ketersediaan informasi pada *database* UniProtKB terus berkembang seiring dengan ditemukannya jenis protein baru dan penelitian yang terus bertambah. Hal inilah yang menyebabkan adanya keterbatasan data yang terdapat pada *database* UniProtKB.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

Metode WSE (*Water Soluble Extraction*) secara *reflux* dan *ultrasound* pada *seaweed Sargassum aquifolium* dapat menghasilkan peptida dengan berat molekul kurang dari 2.000 Da yang teridentifikasi melalui pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE. Berdasarkan analisa *database UniProtKB*, berat molekul peptida yang teridentifikasi pada ekstrak *seaweed* WSE *reflux* dan *ultrasound* merupakan *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* (RuBisCO) dengan subunit besar dan kecil. Peptida RuBisCO dari *seaweed* dapat menjadi komponen menjanjikan dengan aktivitas bioaktif untuk pengembangan DPP-IV, penghambat ACE, dan aktivitas antioksidan. Peptida teridentifikasi pada ekstrak *seaweed Sargassum aquifolium* dengan *sequence* DFVEVPTGSN (1.019 Da) dan DTPDFVEVATESP (1.408 Da) memiliki potensi sebagai *taste-active* peptida yang berkontribusi terhadap rasa *umami*.

6. DAFTAR PUSTAKA

1. FAO. 2018. *The global status of seaweed production, trade and utilization*. Globefish Research Programme, 124. Roma, Italia.
2. Oedjoe, M. D. R., Rebhung, F. & Sunadji. 2019. Rumput Laut (*Kappaphycus alvarezii*) sebagai Komoditas Unggulan dalam Meningkatkan Nilai Tambah Bagi Kesejahteraan Masyarakat di Provinsi Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 11(1): 62-69. DOI: 10.20473/jipk.v11i1.10992
3. Nollet, L. M. L. & Otles, S. 2022. *Bioactive Peptides from Food: Sources, Analysis, and Functions*. CRC Press, Boca Ranton. DOI: DOI: 10.1201/9781003106524
4. Pakidi, C. S. & Suwoyo, H. S. 2017. Potensi dan Pemanfaatan Bahan Aktif Alga Cokelat *Sargassum* sp. *Octopus: Jurnal Ilmu Perikanan*, 6(1): 551–562. DOI: [10.26618/octopus.v5i2.720](https://doi.org/10.26618/octopus.v5i2.720)
5. Pereira, L. 2011. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. In: *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medical Uses*. Nova Science Publishers, Inc., USA.
6. Pratiwi, A. R., Fadlilah, I., Ananingsih, V. K. & Meiliana. 2021. Protein dan asam amino pada edible *Sargassum aquifolium*, *Ulva lactuca*, dan *Gracilariopsis longissima*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(3): 337-346. DOI: 10.17844/jphpi.v24i3.37085
7. Tiwari, B. K. & Troy, D. J. 2015. *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*. Academic Press Elsevier Inc, USA.
8. Wijesekara, I., & Kim, S.-K. 2015. Application of marine algae derived nutraceuticals in the food industry. In *Marine algae extracts*, 627-638. 10.1002/9783527679577.ch35.
9. Kadi, A. 2014. *Seaweed* sebagai produk alami dari perairan Indonesia. *Jurnal Oseana*, 32(3): 31-40. Tersedia pada: http://oseanografi.lipi.go.id/dokumen/os_xxxix_3_2014-4.pdf

10. Ramos, M. V., Monteiro, A. C. O., Moreira, R. A., & Carvalho, A. D. F. A. F. U. 2000. Amino Acid Composition of Some Brazilian Seaweed Species. *Journal of Food Biochemistry*, 24, 33–39. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2000.tb00041.x.
11. Pereira, L. 2016. *Edible Seaweeds of the World*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, USA.
12. Hartmann, R. & Meisel, H. 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food application. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 163-169.
13. Erdmann, K., Cheung, B. W., & Schroder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 643-654.
14. Lafarga, T. & Hayes, M. 2016. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: overcoming current challenges. *Food Reviews International*, 33: 217-246.
15. Fitzgerald, C., Mora-Soler, L., Gallagher, E., O'Connor, P., Prieto, J., Soler-Vila, A., & Hayes, M. 2012. Isolation and characterization of bioactive pro-peptides with in vitro renin inhibitory activities from the macroalga *Palmaria palmate*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 7421-7427.
16. Furuta, T., Miyabe, Y., Yasui, H., Kinoshita, Y., & Kishimura, H. 2016. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from phycobiliproteins of *Dulse Palmaria palmate*. *Marine Drugs*, 14(2): 32.
17. Harnedy, P. A. & FitzGerald, R. J. 2013. In vitro assessment of the cardioprotective, anti-diabetic and antioxidant potential of *Palmaria palmate* protein hydrolysates. *Journal of Applied Phycology*, 25: 1793-1803.
18. Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Akio, K., & Nakano, T. 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6245-6252.
19. Suetsuna, K., Maekawa, W., & Chen, J. R. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 267-272.
20. Suetsuna, K. & Nakano, T. 2000. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11: 450-454.
21. Cian, R. E., Martinez-Augustin, O., & Drago, S. R. 2012. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein byproducts of *Porphyra columbina*. *Food Research International*, 49: 364-372.
22. Gracia-Vaquero, M., Mora, L., & Hayes, M. 2019. In vitro and in silico approaches to generating and identifying angiotensin-converting enzyme I inhibitory peptides from green macroalga *Ulva lactuca*. *Marine Drugs*, 17(4): 204.
23. Heo, S. J., Jeon, Y. J., Lee, J., Kim, H. T., & Lee, W. K. 2003. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a kelp, *Ecklonia cava*. *Algae*, 18: 341-347.
24. Xia, E., Zhai, L., Huang, Z., Liang, H., Yang, H., Song, G. & Tang, H. 2019. Optimization and identification of antioxidant peptide from underutilized *Dunaliella salina* protein: Extraction, In vitro gastrointestinal digestion, and fractionation. *BioMed Research International*.

25. Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology*, 100(13): 3419-3425.
26. Indumathi, P. & Mehta, A. 2016. A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 20: 606-617.
27. Beaulieu, L., Bondu, S., Doiron, K., Rioux, L. E. & Turgeon, S. L. 2015. Characterization of antibacterial activity from protein hydrolysates of the macroalga *Saccharina longicurvis* and identification of peptides implied in bioactivity. *Journal of Functional Foods*, 17: 685-697.
28. Carmeño, M., Kleekayai, T., Amigo-Benavent, M., Harnedy-Rothwell, P. & FitzGerald, R. 2020. Current knowledge on the extraction, purification, identification, and validation of bioactive peptides from seaweed. *Electrophoresis*, 41(20): 1694-1717. DOI: 10.1002/elps.202000153
29. Admassu, H., Gasmalla, M. A., Yang, R., & Zhao, W. 2018. Identification of bioactive peptides with α -amylase inhibitory potential from enzymatic protein hydrolysates of red seaweed (*Porphyra* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19): 4872-4882.
30. Chen, M. F. Zhang, Y. Y., Di He, M., Li, C. Y., Zhou, C. X., Hong, P. Z., & Qian, Z. J. 2019. Antioxidant peptide purified from enzymatic hydrolysates of *Isochrysis Zhanjiangensis* and its protective effect against ethanol induced oxidative stress of HepG2 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 24(2): 308-317.
31. Zhao, W., He, J., Yu, Z., Wu, S., Li, J., Liu, J., & Liao, X. 2021. *In silico* identification of novel small molecule umami peptide from ovotransferrin. *International Journal of Food Science Technology*. DOI: 10.1111/IJFS.15166
32. Keska, P. & Stadnik, J. 2017. Taste-active peptides and amino acids of pork meat as components of dry-cured meat products: An *in-silico* study. *Journal of Sensory Studies*, 32(6): 1-9. DOI: 10.1111/joss.12301
33. Udenigwe, C. C. 2014. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, 36: 137-143. DOI: 10.1016/j.tifs.2014.02.004
34. Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M. & Hryniewicz, M. 2016. Food protein-originating peptides as tastants – Physiological, technological, sensory, and bioinformatics approaches. *Food Research International*, 89: 27-38. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.08.010
35. Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Sieniawski, K. & Starowicz, P. 2016. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Research International*. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.04.031
36. Pliego-Cortés, H., Wijesekara, I., Lang, M., Bourgougnon, N., & Bedoux, G. 2020. Current knowledge and challenges in extraction, characterization and bioactivity of seaweed protein and seaweed-derived proteins. *Advances in Botanical Research*, 95:289-326. 10.1016/bs.abr.2019.11.008
37. Pangestuti, R., & Kim, S.-K. 2015. Seaweed proteins, peptides, and amino acids. *Seaweed Sustainability*, 125-140. 10.1016/B978-0-12-418697-2.00006-4
38. Peng, Y., Xie, E., Zheng, K., Fredimoses, M., Yang, X., Zhou, X., Wang, Y., Yang, B., Lin, X., Liu, J. & Liu, Y. 2012. Nutritional and Chemical Composition and Antiviral Activity of Cultivated Seaweed *Sargassum naozhouense* Tseng et Lu. *Marine Drugs*, 11(1): 20-32. DOI: 10.3390/md11010020

39. Shuuluka, D., Bolton, J. J. & Anderson, R. J. 2013. Protein content, amino acid composition and nitrogen-to-protein conversion factors of *Ulva rigida* and *Ulva capensis* from natural populations and *Ulva lactuca* from an aquaculture system, in South Africa. *Journal of Applied Phycology*, 25: 677-685. DOI: 10.1007/s10811-012-9902-5
40. Laohakunjit, N., Selamassakul, O. & Kerdchoechuen, O. 2014. Seafood-like flavour obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.). *Food Chemistry*, 158:162-170. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.02.101
41. Ryu, B. M., Qian, Z. J., & Kim, S. K. 2010. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS, an COX-2 expression through MAPK and NF-[kappa] B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chemico-Biological Interactions*, 184: 413-422.
42. Samarakoon, K. & Jeon, Y. J. 2012. Bio-functionalities of proteins derived from marine algae-a review. *Food Research International*, 48: 948-960.
43. Milinovic, J., Campos, B., Diniz, M. & Noronha, J. 2020. Umami free amino acids in edible green, red, and brown seaweeds from the Portuguese seashore. *Journal of Applied Phycology*, 32(5): 3331-3339. DOI: 10.1007/s10811-020-02169-2
44. Zhao, Y., Zhang, M., Devahastin, S. & Liu, Y. 2019. Progresses on processing methods of umami substances: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 93: 125-135. 10.1016/j.tifs.2019.09.012
45. Gallego, M., Mora, L. & Toldra, F. 2019. The relevance of dipeptides and tripeptides in the bioactivity and taste of dry-cured ham. *Food Production, Processing and Nutrition*, 1(2). DOI: 10.1186/s43014-019-0002-7
46. Kadam, S. U., Alvarez, C., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. 2016. Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Food Research International*, 99(3): 1021-1027
47. Saepudin, E., Sinurat, E., & Suryabrata, I. A. 2018. Depigmentation and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 299: 1-5. DOI: 10.1088/1757-899X/299/1/012027
48. Li, X., Xie, X., Wang, J., Xu, Y., Yi, S., Zhu, W., Mi, H., Li, T. & Li, J. 2019. Identification, taste characteristics and molecular docking study of novel umami peptides derived from the aqueous extract of the clam *Meretrix meretrix* Lin-naeus. *Food Chemistry*. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.126053
49. Liu, Z., Zhu, Y., Wang, W., Zhou, X., Chen, G. & Liu, Y. 2020. Seven novel umami peptides from *Takifugu rubripes* and their taste characteristics. *Food Chemistry*. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127204
50. Shibata, M., Hirotsuka, M., Mizutani, Y., Takahashi, H., Kawada, T., Matsumiya, K., Hayashi, Y. & Matsumura, Y. 2017. Isolation and characterization of key contributors to the "kokumi" taste in soybean seeds. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. DOI: 10.1080/09168451.2017.1372179
51. Miyamura, N., Lida, Y., Kuroda, M., Kato, Y., Yamazaki, J., Mizukoshi, T. & Miyano, H. 2015. Determination and quantification of kokumi peptide, γ -glutamyl-valyl-glycine, in brewed alcoholic beverages. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.018

52. Li, Q., Zhang, L. & Lametsch, R. 2020. Current progress in kokumi-active peptides, evaluation and preparation methods: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. DOI: 10.1080/10408398.2020.1837726
53. Mæhre, H. K., Dalheim, L., Edvinsen, G. K., Elvevoll, E. O., & Jensen, I-J. 2018. Protein Determination – Method Matters. *Foods*, 7(5): 1-11. DOI: 10.3390/foods7010005
54. Schägger, H. 2006. Protocol: Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1): 16-22. DOI: 10.1038/nprot.2006.4
55. Schägger, H., & Jagow, G. V. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166 (2), 368-379. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90587-2
56. Yip, W. H., Joe, L. S., Mustapha, W. A. W., Maskat, M. Y., & Said, M. 2014. Characterisation and stability of pigments extracted from *Sargassum binderi* obtained from Semporna, Sabah. *Sains Malaysiana*, 43(9): 134-1354.
57. Tambun, R., Limbong, H. R., Pinem, C., & Manurung, E. 2017. Pengaruh ukuran partikel, waktu dan suhu pada ekstraksi fenol dari lengkuas merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 5(4). DOI: 10.32734/jtk.v5i4.1555
58. Hazmi, G. G. A. & Harijono. 2019. Pengaruh Pengeringan dan Lama Maserasi dengan Pelarut Ganda Etanol dan Heksana terhadap Senyawa Bioaktif Daging Biji Palem Putri (*Veitchia merillii*). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 7(2): 13-23. DOI: 10.21776/ub.jp.a.2019.007.02.2
59. Ji, P., Zou, J., & Feng, W. 2009. Effect of alcohol on the solubility of amino acid in water. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56: 185-188. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.06.008
60. Fan, S-H., Liu, T-T., Wan, P., Zhu, Q., Xia, N., Wang, Q-Z., & Chen, D-W. 2021. Enrichment of the umami-taste-active amino acids and peptides from crab sauce using ethanol precipitation and anion-exchange resin. *Journal of Food Processing and Preservation*. 1-8. DOI: 10.1111/jfpp.15390
61. Noble, J. E. & Bailey, M. J. A. 2009. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 463, 73-95. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1
62. Schaich, K. M. 2016. Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods. *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*, 1-131. DOI: 10.1016/B978-1-63067-056-6.00001-X
63. Barea, P., Melgosa, R., Illera, A. E., Alonso-Riaño, P., Díaz de Cerio, E., Benito-Román, O., Beltrán, S., & Sanz, M. T. 2023. Production of small peptides and low molecular weight amino acids by subcritical water from fish meal: Effect of pressurization agent. *Food Chemistry*, 418. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.135925
64. Legler, G., Müller-Platz, C. M., Mentges-Hettkamp, M., Pflieger, G., & Jülich, E. 1985. On the Chemical Basis of the Lowry Protein Determination. *Analytical Biochemistry*, 150, 278-287. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90511-1
65. Rath, A., Cunningham, F., & Deber, C. M. 2013. Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(39): 15668-15673
66. Rivera, C. E., Rosales, J. D., Freitas-Perez, J. C., & Rodriguez, E. 2018. Very Low Molecular Weight Proteins Electrophoresis Protocol. *Bio-Protocol Journal*. DOI: 10.21769/BioProtoc.3093

67. Jiang, S., Liu, S., Zhao, C. & Wu, C. 2016. Developing Protocolsof Tricine-SDS-PAGE for Separation of Polypeptides in the Mass Range 1-30 kDa with Minigel Electrophoresis System. *International Journal of Electrochemical Science*, 11: 640-649.
68. Baharuddin, M., Amat, H., Febryanti, A., Sappewati, & Azis, F. 2021. Characterization of sarcoplasmic protein in the meat using SDS-PAGE method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 762: 1-5. DOI: 10.1088/1755-1315/762/1/012071
69. The UniProt Consortium. 2015. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43: D204-D212. DOI: 10.1093/nar/gku989
70. Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M. D. Guiry). *Carpophyllum plumosum* (A. Richard) J. Agardh, 1878. Diakses melalui World Register of Marine Species di <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=373349> pada 12 Oktober 2023
71. Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M. D. Guiry). *Sargassum thunbergii* (Mertens ex Roth) Kuntze, 1880. Diakses melalui World Register of Marine Species di <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=494874> pada 12 Oktober 2023
72. Guiry, M. D. & Guiry, G. M. 2023. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway (taxonomic information republished from AlgaeBase with permission of M. D. Guiry). *Sargassum (Sargassum) ilicifolium* (Turner) C. Agardh, 1820. Diakses melalui World Register of Marine Species di <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211937> pada 12 Oktober 2023
73. Udenigwe, C. C., Okolie, C. L., Qian, H., Ohanenye, I. C., Agyei, D., & Aluko, R. E. 2017. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase as a sustainable and promising plant source of bioactive peptides for food applications. *Trends on Food Science and Technology*, 69: 74-82. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.09.001
74. Spreitzer, R. J., & Salvucci, M. E. 2002. RUBISCO: Structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 449-475. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135233
75. Kose, A. 2021. In silico bioactive peptide prediction from the enzymatic hydrolysates of edible seaweed rubisco large chain. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 21(12): 615-626. DOI: 10.4194/1303-2712-v21_12_04
76. Wang, W., Cui, Z., Ning, M., Zhou, T., & Liu, Y. 2022. In-silico investigation of umami peptides with receptor T1R1/T1R3 for the discovering potential targets: A combined modeling approach. *Biomaterials*, 281. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121338
77. Chaudhari, N., Pereira, E., & Roper, S. D. 2009. Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90: 738S-742S. DOI: 10.3945/ajcn.2009.27462h
78. Choudhury, S. & Sekar, N. S. 2017. Algae as source of natural flavor enhancers – a mini review. *Plant Science Today*, 4: 172-176. DOI: 10.14719/pst.2017.4.4.338