

Identifikasi Peptida Umami dan Kokumi pada Rumput Laut *Sargassum aquifolium* dengan Pendekatan In Silico

Identification of Umami and Kokumi Peptides in Seaweed Sargassum aquifolium using In Silico Approach

Bernadeta Pingkan Larasati¹, Bernadeta Soedarini¹, Dea Nathania Hendryanti¹, Christiana Retnaningsih¹, Dina Fatmawati², dan Alberta Rika Pratiwi^{1*}

¹Universitas Katolik Soegijapranata, Jl. RM. Hadi Soebeno Sosrowardojo No. 2, Semarang, 50215, Indonesia

²Universitas Islam Sultan Agung, Jl. Raya Kaligawe KM. 4, Semarang, 50112, Indonesia

*Korespondensi penulis : pratiwi@unika.ac.id

Diterima: 22 November 2023; Direvisi: 26 Februari 2024; Disetujui: 22 Juni 2025

ABSTRAK

Sargassum aquifolium memiliki kandungan protein dan asam glutamat yang tinggi, sehingga dapat dimanfaatkan menjadi bahan penyedap rasa. Rasa *umami* dapat dihasilkan oleh peptida *taste-active* yang berkontribusi dalam meningkatkan rasa *umami* dan memberikan sensasi rasa *kokumi*. Meskipun banyak penelitian mengenai peptida *umami* dan *kokumi* dalam bahan pangan, namun penelitian sejenis pada rumput laut belum banyak ditemukan. Analisis *in silico* telah banyak dilakukan untuk memprediksi dan mengidentifikasi peptida dengan *taste-active umami* dan *kokumi* pada bahan pangan dan efektif dalam mengevaluasi rasa peptida sebelum dilakukan evaluasi secara *in vitro* dan *in vivo*. Tujuan penelitian ini adalah memprediksi dan mengidentifikasi keberadaan peptida *taste-active* yang berkontribusi terhadap rasa *umami* dan *kokumi* pada rumput laut *S. aquifolium* dengan analisis *in silico*. Ekstraksi peptida *S. aquifolium* menggunakan pelarut air dengan metode *reflux* dan *ultrasound*, isolasi dan purifikasi peptida berdasarkan berat molekul. Peptida hasil isolasi dianalisis berat molekulnya menggunakan *Tricine*-SDS-PAGE dan aktivitas sensori potensial secara *in silico* menggunakan database BIOPEP-UWM. Hasil penelitian menunjukkan analisis *Tricine*-SDS-PAGE menemukan 5 pita peptida yaitu 673 Da, 797 Da, 1.019 Da, 1.195 Da, dan 1.408 Da. Analisis *in silico* menunjukkan sekuen DFVEVPTGSN (1.019 Da) dan DTPDFVEVATESP (1.408 Da) diprediksi sebagai peptida *umami* yang ditandai adanya residu asam amino aspartat (D), dan asam amino glutamat (E), serta peptida ES, EV, TE, VE. Namun, tidak ditemukan peptida yang menunjukkan potensi kokumi. Pendekatan ekstraksi *Water Soluble Extraction* (WSE) menggunakan metode *reflux* dan *ultrasound*, serta pendekatan dengan *in silico* berhasil mengidentifikasi peptida *taste-active umami*, namun kurang efektif dalam mengidentifikasi peptida *kokumi* dari *S. aquifolium*.

KATA KUNCI: *Sargassum aquifolium*, aktivitas sensori potensial, peptida *umami*, *in silico*

ABSTRACT

Sargassum aquifolium has high protein and glutamic acid to be used as a flavor enhancer. The umami taste can be produced by taste-active peptides which contribute to enhancing umami taste and providing kokumi taste sensation. Although there has been a lot of research on umami and kokumi peptides, similar research on seaweed has not been widely found. In silico analysis has been carried out to predict and identify taste-active peptides umami and kokumi in food and is effective in evaluating the taste of peptides before in vitro and in vivo evaluation. This research aimed to predict and identify taste-active peptides that contributed to umami and kokumi in *S. aquifolium* using in silico analysis. This research consisted of extracting *S. aquifolium* peptides using water with reflux and ultrasound methods, isolating and purifying peptides based on molecular weight. The isolated peptides were analyzed for their molecular weight using *Tricine*-SDS-PAGE and in silico potential sensory activity analysis using the BIOPEP-UWM database. Based on the *Tricine*-SDS-PAGE analysis, found 5 peptide bands 673 Da, 797 Da, 1,019 Da, 1,195 Da, and 1,408 Da. In silico analysis showed that the sequences of DFVEVPTGSN (1,019 Da) and DTPDFVEVATESP (1,408 Da) were predicted as umami peptides characterized by the presence of aspartate (D) and glutamic (E) amino acid residues, as well as ES, EV, TE, and VE peptides. However, no peptides were found that showed kokumi potential. The Water Soluble Extraction (WSE) approach using the reflux and ultrasound method, as well as in silico approach, succeeded in identifying the taste-active umami peptide, but was less effective in identifying the taste-active kokumi peptide from *S. aquifolium*.

KEYWORDS: *Sargassum aquifolium*, potential taste-active peptide, umami-tastepeptide, in silico

PENDAHULUAN

Sargassum sp. merupakan salah satu jenis rumput laut cokelat (*Phaeophyta*) yang keberadaannya sangat melimpah dan tersebar luas di perairan Indonesia (Kadi, 2014; Pakidi & Suwoyo, 2017). *Sargassum* sp. memiliki kandungan protein yang tinggi berkisar 11,60 – 16,30% (Pereira, 2011; Ramos et al., 2000). Salah satu jenis rumput laut *Sargassum* sp. yang banyak tumbuh di perairan Indonesia adalah *Sargassum aquifolium*. *S. aquifolium* biasa dikonsumsi sebagai bahan makanan di berbagai negara termasuk di Indonesia (Pereira, 2016). Penelitian terhadap konsentrasi protein dan asam amino pada *S. aquifolium* menunjukkan rumput laut jenis ini memiliki kandungan protein dan asam amino *umami* (asam glutamat dan asam aspartat) yang lebih tinggi dibandingkan dengan *edible* rumput laut lain seperti *Ulva lactuca* dan *Gracilariopsis longissima* (Pratiwi et al., 2021). Tingginya kandungan protein, asam amino glutamat, dan aspartat menyebabkan *S. aquifolium* memiliki *flavor* dan rasa *umami*. Sensasi rasa inilah yang menyebabkan rumput laut ini digemari untuk dikonsumsi dalam bentuk mentah atau matang (Pereira, 2016), serta dapat dimanfaatkan menjadi bahan utama penyedap rasa (Pratiwi et al., 2020).

Penelitian terbaru mengungkapkan bahwa selain asam amino *umami* dan 5'-nukleotida, peptida *taste-active* juga memberikan efek sinergis terhadap peningkatan rasa *umami* dalam makanan (Zhang et al., 2017) dan berkontribusi dalam memberikan sensasi rasa *kokumi* (Hartley et al., 2019; Kurihara, 2015). Peptida *taste-active* dapat berfungsi sebagai prekursor aroma terhadap rasa makanan *umami* dan *kokumi* (Xu et al., 2018), selain itu juga memiliki potensi untuk diaplikasikan sebagai modulator rasa dan meningkatkan palatabilitas pada produk makanan (Li et al., 2020; Salger et al., 2019; Suzuki et al., 2017). Penelitian sebelumnya telah banyak dilakukan untuk mengidentifikasi rantai peptida *taste-active umami* dan *kokumi* yang terdapat dalam bahan pangan nabati, hewani, maupun produk fermentasi. Beberapa peptida *taste-active* seperti EE, EL, LE, VE, TGC, GLE, VEAL (Zhu et al., 2020), GE, GCG (Kong et al., 2019), KGDEESLA (Yamasaki & Maekawa, 1978), SSRNEQSR, EGSEAPDGSSR (Su et al., 2012) memberikan rasa *umami* dan peptida γ -EE, γ -EC, γ -EL, LE (Zhu et al., 2020), γ -ECG, γ -EAC (Ueda et al., 1990), γ -EVG (Kuroda et al., 2013) memberikan rasa *kokumi*.

Identifikasi peptida sebelumnya dilakukan dengan menggunakan prinsip kromatografi seperti LC-MS/MS (Kuroda et al., 2012; Miyamura et al.,

2014; Hillman & Hofmann, 2016; Amin et al., 2020), LC-Q-TOF-MS (Xu et al., 2018; Kong et al., 2018; Liu et al., 2020), UPLC-Q-TOF-MS (Shibata et al., 2017; Feng et al., 2019; Zhu et al., 2020), UPLC-MS/MS (Phewpan et al., 2020; Zhang et al., 2019b), atau HPLC-MS/MS (Toelstede & Hofmann, 2009; Hillman & Hofmann, 2016). 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, cakupan sampel yang terbatas, dan hasil peptida terisolasi yang rendah (Udenigwe, 2014; Zhao et al., 2022), sehingga perlu adanya metode penelitian yang lebih sederhana.

Dalam ekstraksi rumput laut, kehadiran polisakarida seperti alginat, polifenol (Harnedy & FitzGerald, 2013), serta protein yang berikatan dengan dinding sel menyebabkan proses ekstraksi menjadi lebih kompleks, sehingga diperlukan metode ekstraksi yang tepat. Metode ekstraksi dengan penggilingan mekanis (Barbarino & Lourenco, 2005) dan *osmotic shock* (Joubert & Fleurence, 2008) dapat membantu dalam pemecahan dinding sel rumput laut dan meningkatkan peptida yang dihasilkan. Penambahan air dalam proses ekstraksi peptida rumput laut dapat menimbulkan *osmotic shock* pada rumput laut sehingga peptida *taste-active umami* dan *kokumi*, serta asam amino *umami* (Glu dan Asp) yang merupakan komponen hidrofilik dapat larut dalam pelarut air selama proses ekstraksi (Cermeño et al., 2020; Zhao et al., 2019). Metode ekstraksi dengan pelarut air (*Water Soluble Extraction/WSE*) dapat dilakukan dengan beberapa macam metode, dua diantaranya dengan metode *reflux* dan *ultrasound*. Metode *reflux* merupakan metode ekstraksi dengan perlakuan panas dan memerlukan jumlah pelarut yang lebih sedikit karena proses ekstraksi berlangsung secara kontinyu, sedangkan metode ekstraksi *ultrasound* merupakan teknik yang menggunakan perlakuan frekuensi berkisar 20 kHz sampai 2.000 kHz yang akan mengaktifkan permeabilitas dinding sel sehingga lebih banyak komponen senyawa yang dapat terekstraksi ke dalam pelarut (Dewi et al., 2016; Kadam et al., 2015). Selain itu, metode ekstraksi WSE telah banyak diterapkan dalam penelitian terkait ekstraksi peptida *taste-active umami* dan *kokumi* pada bahan pangan dengan menggunakan metode *reflux* (Shibata et al., 2017; Feng et al., 2019; Li et al., 2019; Zhang et al., 2012) dan kombinasi metode *reflux* dan *ultrasound* (Liu et al., 2020).

Analisis secara *in silico* telah dilakukan untuk memprediksi dan mengidentifikasi peptida termasuk peptida dengan *taste-active umami* dan

kokumi. Analisis peptida *taste-active* secara *in silico* menjadi metode yang efektif dalam mengevaluasi rasa peptida sebelum dilakukan evaluasi secara *in vitro* dan *in vivo* (Kęska & Stadnik, 2017). Selain itu, metode *in silico* lebih hemat biaya dan telah dilakukan dalam beberapa penelitian sebelumnya terkait sensori dan rasa dari peptida (Iwaniak et al., 2016a; Iwaniak et al., 2016b; Zhao et al., 2022; Kęska & Stadnik, 2017; Li et al., 2019).

Meskipun telah banyak dilakukan penelitian mengenai peptida *taste-active umami* dan *kokumi* dalam bahan pangan, namun belum ada kajian yang berasal dari sumber *umami* rumput laut khususnya *Sargassum* sp. yang berlimpah di Indonesia. Adanya kemungkinan kontribusi dan peningkatan sensasi rasa yang kompleks dari peptida *taste-active*, membuat pentingnya dilakukan penelitian mengenai peptida *taste-active* yang terkandung dalam *Sargassum aquifolium* untuk meningkatkan kualitas komponen rasa dari penyedap rumput laut ini (Pratiwi et al., 2020) dan memberikan manfaat dalam pengembangan potensi rumput laut di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk memprediksi dan mengidentifikasi keberadaan peptida *taste-active* yang berkontribusi terhadap rasa *umami* dan *kokumi* pada rumput laut *S. aquifolium* dengan analisis *in silico*.

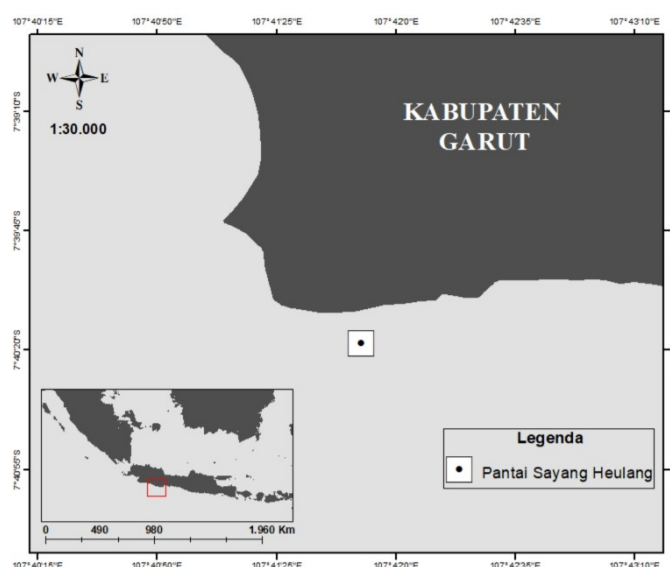
BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini berupa blender (Philips HR 2115), mesh 20 dan 80, oven

(Binder ED56), *ultrasonic processor* (Branson 1510), kertas saring (Whatmann No. 1), membrane 0,45 µm (Sartorius SC 0,45 µm), tabung ultrasentrifugasi 10.000 Da (Amicon® Ultra-15 *Centrifugal Filter Units*), sentrifuge dingin (*Eppendorf Centrifuge* 5430 R), sentrifuge (Hettich EBA 20), spektrofotometer (UV-VIS 1800 Shimadzu), Biometra *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad), *power supplies* (Bio-Rad), *fixing box*, *stain* dan *destain box*, *gel documentation system* (Bio-Rad), neraca analitik (Ohaus), *magnetic stirrer*, *pipette tips* 10-1000 µL (Bio-Rad), *blue tip* 1000 µL (OneMed), vortex (Thermolyne), Erlenmeyer (Pyrex), beaker glass (Pyrex), pipet volume (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), corong (Pyrex), labu takar 100 mL (Pyrex).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa sampel rumput laut *Sargassum aquifolium* (Turner) C. Agardh yang diambil dari Pantai Sayang Heulang Garut, Jawa Barat pada bulan Juli 2022 lalu dicuci dan dikeringkan menggunakan *Solar Tunnel Dryer*, *Mini-Protean Tris-Tricine Precast Gels* 16,5% (Bio-Rad), *Tris/Tricine/SDS buffer* (Bio-Rad), buffer sampel *Tricine* (Bio-Rad), β-mercaptoetanol (Bio-Rad), *Coomassie Blue* (*Coomassie Nano Protein Staining Solution*, Bio-Helix), marker protein *Ultra Low Range Molecular Weight Marker* 1.060 – 26.600 Da (SIGMA), marker protein *Precision Plus Protein Dual Xtra Standards* 2.000 – 250.000 Da (Bio-Rad), NaOH (Merck), NaCl (Merck), Na₂CO₃ (Merck), CuSO₄ (Merck), KNaC₄H₄O₆·4H₂O (Merck), Folin (Merck), BSA (*Bovine Serum Albumine*) (Merck).



Gambar 1. Lokasi dan titik pengambilan sampel
Figure 1. Location and sample collection point

Metode

Preparasi *Sargassum aquifolium*

Sargassum aquifolium kering dicuci dengan air hingga bersih dari pasir, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Rumput laut kering kemudian dihaluskan dan diayak dengan *mesh* 80 untuk memperoleh tepung rumput laut *S. aquifolium*.

Sampel kering selanjutnya dihilangkan pigmennya dengan perendaman *food grade* etanol 96% dengan rasio 1:10 (w/v) selama 24 jam, suhu 25°C dengan pengadukan konstan 250 rpm menggunakan *magnetic stirrer*. Pergantian larutan perendaman dilakukan setiap hari hingga warna memudar (Saepudin et al. 2018). *S. aquifolium* hasil depigmentasi kemudian dipisahkan dari pelarut dan dikeringkan pada suhu ruang.

Ekstraksi peptida *Sargassum aquifolium*

Ekstraksi peptida dilakukan dengan dua macam metode yaitu *reflux* dan *ultrasound*. Proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut air atau WSE. Hasil ekstraksi dari masing-masing metode kemudian difiltrasi menggunakan ultrafiltrasi (UF).

Ekstraksi peptida rumput laut menggunakan metode *reflux* sesuai dengan metode Li et al. (2019) & Liu et al. (2020) dengan modifikasi. Biomassa kering *S. aquifolium* hasil dari depigmentasi dilarutkan dengan *aquades* 1:10 (w/v), kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 20 menit

dengan pengadukan konstan 250 rpm menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifuge (Hettich EBA 20 dengan tipe rotor *fixed-angle*) dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit dilanjutkan dengan pre-filtrasi menggunakan membran filter 0,45 µm.

Ekstraksi peptida rumput laut dengan metode *ultrasound* mengacu pada Liu et al. (2020). Biomassa kering *S. aquifolium* yang telah dihilangkan pigmen warnanya dilarutkan dengan *aquades* 1:10 (w/v) dan dimaserasi pada suhu 4°C selama 2 jam. Tahapan berikutnya ekstraksi menggunakan *ultrasound processor* selama 30 menit dengan amplitude 70% dan frekuensi 53 kHz, selanjutnya pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Hasil ekstraksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, selanjutnya filtrat dipre-filtrasi menggunakan membran filter 0,45 µm.

Pemisahan peptida dengan ultrafiltrasi (UF)

Pemisahan dan purifikasi peptida dilakukan berdasarkan prinsip ultrafiltrasi (Shibata et al., 2017; Miyamura et al., 2015; Liu et al., 2020; Li et al., 2020). Ekstrak *S. aquifolium* dipisahkan melalui sistem ultrafiltrasi menggunakan tabung ultrasentrifugasi membran 10.000 Da. Proses pemisahan dilakukan dengan sentrifugasi kecepatan 5000 rpm menggunakan *fixed rotor* pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan hasil filtrasi (<10.000 Da) kemudian dianalisis kandungan protein dan fraksi berat molekulnya.



Gambar 2. *Sargassum aquifolium* sebelum dikeringkan
Figure 2. *Sargassum aquifolium* before drying process



Gambar 3. *Sargassum aquifolium* setelah dikeringkan

Figure 3. *Sargassum aquifolium* after drying process

Analisis kandungan protein menggunakan metode Lowry

Analisis kandungan protein diperlukan sebagai dasar untuk menentukan volume sampel saat dilakukan *loading* pada pemisahan peptida dengan *Tricine*-SDS-PAGE. Analisis protein dilakukan sesuai dengan Mæhre et al. (2018) dengan modifikasi. Analisis dilakukan pada sampel filtrat hasil ekstraksi *reflux* dan *ultrasound*, serta filtrat <10.000 Da dari pemisahan ultrafiltrasi setelah proses ekstraksi *reflux* dan *ultrasound*. 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 Na_2CO_3 2% dalam larutan NaOH 0,1 N (1) dan larutan campuran CuSO_4 0,5% dalam larutan $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1% (2). Larutan tersebut selanjutnya divortex dan didiamkan selama 15 menit. Tahapan selanjutnya, larutan ditambahkan dengan larutan folin (1:10) sebanyak 0,5 mL kemudian divortex dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada 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 absorbansinya dihitung pada panjang gelombang 650 nm.

Pengukuran berat molekul peptida dengan *Tricine*-SDS-PAGE

Identifikasi peptida berdasarkan berat molekulnya diawali dengan menghitung berat molekul dari fraksi peptida menggunakan metode *Tricine*-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide

Gel Electrophoresis (*Tricine*-SDS-PAGE) berdasarkan metode Schägger & Jagow (1987) dan Schägger (2006) dengan modifikasi. Pada 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, serta menggunakan *precast gel Tris-Tricine* 16,5% dengan 10 sumur. Persiapan sampel dimulai dengan menambahkan *buffer* sampel *tricine* pada ekstrak rumput laut yang merupakan supernatan hasil filtrasi (<10.000 Da). *Buffer* sampel *tricine* terdiri dari 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 40% gliserol, 2% SDS, dan 0,04% *Coomassie Blue* G-250, kemudian ditambahkan agen pereduksi berupa β -mercaptoetanol dengan konsentrasi akhir 2% (v/v). Perbandingan sampel dengan *buffer* sampel *tricine* 1:2 yaitu sebanyak 10 μL sampel ekstrak rumput laut ditambahkan dengan 20 μL *buffer* sampel *tricine* kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 15 menit. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 20 μL /sumur. *Buffer running* yang digunakan adalah 100 mL *buffer Tris/Tricine* (BioRad) ditambahkan dengan ddH_2O sampai volume akhir mencapai 1 L. Proses *running* sampel dilakukan dalam kondisi tegangan konstan 100 V selama 240 menit, kemudian dilanjutkan dengan proses pewarnaan *Coomassie blue*.

Proses pewarnaan *Coomassie blue* dilakukan dengan inkubasi gel di dalam 0,025% pewarna *Coomassie* dalam 10% asam asetat selama *overnight*, kemudian dihilangkan warnanya dengan menginkubasi gel dalam 5% asetat glasial dalam metanol sebanyak dua kali masing-masing selama 5 menit, selanjutnya gel dipindah dalam ddH_2O . Tahapan selanjutnya dilakukan pengukuran pada pita protein dari hasil *Tricine*-SDS-PAGE dengan

mencari nilai Retardation Factor (Rf) dari pita protein dengan rumus berikut:

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

Selanjutnya nilai Rf dimasukkan ke dalam persamaan regresi polynomial order 2 dengan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan:

y = log BM

x = Rf

BM = anti log y

Analisis *in silico*

Analisis *in silico* atau bioinformatika terbagi menjadi dua tahap yaitu mengidentifikasi profil dan rantai (*sequence*) peptida berdasarkan berat molekul, selanjutnya memprediksi aktivitas sensori atau *taste-active* potensial dari peptida teridentifikasi. Analisis profil dan rantai peptida dilakukan dengan mengakses *Protein Data Bank* UniProtKB, sedangkan prediksi peptida *taste-active* potensial, frekuensi kemunculan fragmen sensorik pada peptida, dan analisis proteolisis peptida teridentifikasi dilakukan menggunakan *database* BIOPEP.

Identifikasi profil peptida berdasarkan berat molekul peptida

Analisis bioinformatika dilakukan untuk mengetahui profil dan rantai (*sequence*) peptida berdasarkan berat molekul yang telah diketahui dengan mengakses *Protein Data Bank* pada UniProtKB melalui <https://www.uniprot.org> (Udenigwe, 2014), sehingga diketahui urutan rantai peptida (*sequence*) dan berat molekul peptida (Da) berdasarkan spesies organisme yg digunakan yaitu *Sargassum* atau *Sargassum aquifolium*.

Prediksi *taste-active* potensial peptida teridentifikasi

Taste-active potensial dari peptida yang teridentifikasi diprediksi menggunakan *database* BIOPEP <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/> melalui menu peptida sensorik dan asam amino. Analisis dilakukan dengan memilih menu "*analysis*" kemudian pilih "*profiles of sensory activity*" dan masukkan rantai peptida teridentifikasi pada menu "*for your sequence*". Setelah hasil prediksi aktivitas sensori potensial atau *taste-active* potensial dari rantai peptida muncul, data disortir

berdasarkan urutan peptida dengan memilih menu "*sort by sequence*" untuk mengetahui *taste-active* potensial peptida berdasarkan urutan rantai peptida (Iwaniak et al., 2016b; Kęska & Stadnik, 2017; Hakimi et al., 2022).

Frekuensi kemunculan fragmen sensorik pada peptida teridentifikasi

Frekuensi kemunculan fragmen sensorik dalam urutan rantai peptida (A) dihitung menurut persamaan $A = a/N$, dimana a adalah jumlah fragmen dengan jenis *taste-active* potensial tertentu dalam urutan peptida dan N adalah jumlah residu asam amino dalam peptida (Udenigwe, 2014; Iwaniak et al., 2016b; Dziuba et al., 2003). Analisis dilakukan dengan mengakses *database* BIOPEP <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>, selanjutnya pilih melalui menu "*sensory peptides and amino acids*" kemudian memilih submenu "*analysis*" dan "*calculations*". Urutan peptida teridentifikasi dimasukkan pada kolom *sequence* yang tersedia pada menu "*for your sequence*" untuk memasukkan rantai peptida teridentifikasi pada kolom lalu "*report*".

Proteolisis peptida teridentifikasi menggunakan *in silico*

Proteolisis merupakan proses pemecahan protein menjadi polipeptida atau peptida menjadi asam amino yang lebih kecil. Proses proteolisis secara *in silico* dianalisis menggunakan *database* BIOPEP <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>. Dalam penelitian ini, hidrolisis rantai peptida teridentifikasi menggunakan enzim protease (*Glutamyl endopeptidase*) pH 7,8 (EC 3.4.21.19), enzim tripsin (EC 3.4.21.4), enzim pepsin pH >2 (EC 3.4.23.1), dan enzim papain (EC 3.4.22.2). Analisis diawali dengan mengakses *database* BIOPEP kemudian pilih menu "*sensory peptides and amino acids*", selanjutnya pilih menu "*analysis*" dan "*enzyme(s) action*". Tahapan selanjutnya pilih menu "*for your sequence*" untuk memasukkan urutan peptida yang telah teridentifikasi dimasukkan pada kolom "*paste the sequence*" kemudian pilih menu "*enzyme id*" untuk memilih jenis enzim yang digunakan dan selanjutnya pilih menu "*view the report with the results*".

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Protein pada Ekstrak *Sargassum aquifolium*

Kandungan protein rumput laut setelah proses WSE baik secara *reflux* dan *ultrasound* mengalami

penurunan sebesar 55-59% dibandingkan dengan kandungan protein pada rumput laut sebelum proses ekstraksi (Tabel 1). Pada proses WSE *reflux* terjadi kenaikan suhu selama 20 menit yang menyebabkan terjadinya proses proteolisis yaitu terjadi perubahan terhadap struktur protein yang terpecah menjadi rantai peptida yang lebih kecil dan asam amino. Meningkatnya suhu saat proses ekstraksi dapat meningkatkan komponen peptida yang terbentuk dari pemecahan protein (Ikeda, 2002; Hartley et al., 2019), sedangkan proses WSE *ultrasound* mampu memecah matriks rumput laut yang dihasilkan dari proses turbulensi mikro dan tumbukan antarpartikel sehingga terjadi pelepasan protein dari dinding sel dan pemecahan rantai protein (Kadam et al., 2015). Terpecahnya kandungan protein menjadi rantai peptida yang lebih kecil mengurangi intensitas pembentukan warna biru pada analisis Lowry, karena metode ini lebih sensitif terhadap molekul protein besar dibandingkan peptida kecil, sehingga hasil kandungan protein yang terdeteksi pada WSE *reflux* dan WSE *ultrasound* cenderung menurun. Dalam penelitian ini, proses WSE baik secara *reflux* maupun *ultrasound* menghasilkan kandungan protein yang tidak jauh berbeda (Tabel 1).

Prinsip dari analisis Lowry adalah reaksi antara protein dengan tembaga sulfat alkali dan kehadiran natrium kalium tartrat yang membentuk ikatan kompleks tembaga tetradentat (ikatan empat peptida: satu atom tembaga). Tembaga (Cu^+) dalam ikatan kompleks tersebut kemudian mereduksi asam fosfomolibdat-fosfotungstat (reagen fenol Folin-Ciocalteu) untuk menghasilkan warna biru pekat (Schaich, 2006). Metode Lowry memiliki

tingkat sensitivitas hingga sekitar 0,01 mg protein/mL dan paling baik digunakan pada larutan dengan konsentrasi dalam kisaran 0,01–1,0 mg/mL protein (Waterborg, 2009). Selain itu, analisa Lowry juga sensitif terhadap banyak senyawa pengganggu yang dapat menghasilkan respons terhadap hasil yang tidak linier. Hal ini dapat membuat terganggunya ekstrapolasi data menjadi lebih rumit (Noble & Bailey, 2009).

Dalam analisis protein menggunakan metode Lowry, intensitas warna yang terbentuk juga bergantung pada ukuran protein dan komposisi asam amino. Pembentukan warna meningkat seiring dengan besarnya ukuran peptida yang sebanding dengan jumlah ikatan peptida yang terdapat dalam larutan. Semakin panjang ikatan peptida, maka semakin pekat intensitas warna yang terbentuk (Noble & Bailey, 2009; Schaich, 2016). Oleh karena itu, peptida dengan ukuran yang kecil menghasilkan jumlah warna (intensitas warna) yang rendah. Hal serupa juga terjadi pada penelitian Barea et al., (2023) dimana analisis kandungan total protein dengan metode Lowry menghasilkan intensitas warna yang rendah dalam menganalisis kandungan peptida dengan rantai pendek dan asam amino dengan berat molekul yang kecil.

Komposisi asam amino seperti rantai samping juga mempengaruhi intensitas warna biru yang terbentuk. Peptida tanpa rantai samping yang mudah teroksidasi secara ideal memberikan dua ekuivalen reduksi pada kompleks Cu^{2+} tetradentat dengan hasil samping berupa imino-peptida, sedangkan peptida yang memiliki rantai samping aromatik akan memiliki penambahan empat ekuivalen yang akan

Tabel 1. Kandungan Protein pada Rumput Laut *Sargassum aquifolium*
Table 1. Protein content in seaweed *Sargassum aquifolium*

Sampel/Sample	Perlakuan/Treatment	Kandungan Protein (mg/100g)/ Protein Content (mg/100g)
<i>Sargassum aquifolium</i>	Depigmentasi 72 jam/ <i>Depigmentation 72 hours</i>	740.4925 ± 12.51
Ekstrak <i>Reflux</i> /Reflux extract	WSE <i>Reflux</i> /Water Soluble Extraction with Reflux	332.6239 ± 10.73
Ekstrak Reflux <10.000 Da/Reflux extract <10,000 Da	Ultrafiltrasi/Ultrafiltration	415.3419 ± 0.39
Ekstrak <i>Ultrasound</i> /Ultrasound Extract	WSE <i>Ultrasound</i> /Water Soluble Extraction with Ultrasound	305.1026 ± 9.96
Ekstrak Ultrasound <10.000 Da/ Ultrasound extract <10,000 Da	Ultrafiltrasi/Ultrafiltration	358.2479 ± 0.27

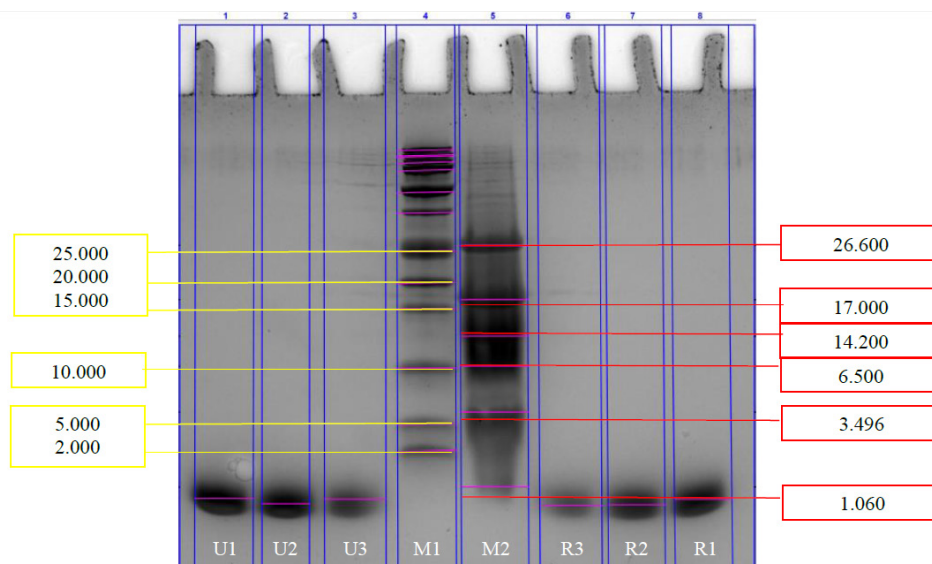
meningkatkan intensitas pembentukan warna biru (Legler et al., 1985). Kandungan asam amino tirosin (Y) dan triptofan (W) memiliki gugus fenol dan gugus indol yang teroksidasi dan menyumbangkan 4 elektron pada Folin sehingga meningkatkan warna biru, sedangkan asam amino sistein (C) dan histidin (H) berkontribusi sedang hingga rendah terhadap pembentukan warna pada reaksi Lowry. Hal ini dikarenakan sistein (C) memiliki gugus tiol yang dapat teroksidasi membentuk disulfida dan histidin (H) memiliki gugus imidazol yang termasuk gugus aromatik dan dapat teroksidasi sebagian. Asam amino seperti metionina (M), lisina (K), arginina (R), aspartat (D), glutamat (E), serina (S), treonina (T), prolina (P), glisina (G), alanin (A), valina (V), leusina (L), dan isoleusina (I) memiliki susunan gugus rantai yang relatif stabil dan tidak reaktif terhadap folin, sehingga tidak berkontribusi terhadap pembentukan warna (Waterborg, 2009; Schaich, 2016; Legler et al., 1985).

Proses ultrafiltrasi membran 10.000 Da menghasilkan kandungan protein yang lebih tinggi berkisar 14 sampai 20% dibandingkan dengan kandungan protein pada ekstrak rumput laut hasil WSE sebelum melalui proses ultrafiltrasi membran (Tabel 1.). Pemisahan dengan ultrafiltrasi (UF) merupakan suatu proses pemekatan dan pemurnian awal yang dipengaruhi oleh permeabilitas membran

terhadap perbedaan ukuran partikel terlarut (Belter et al., 1988). Dalam proses ini partikel dengan ukuran lebih besar (> 10.000 Da) tertahan di permukaan membran dan partikel yang berukuran lebih kecil (< 10.000 Da) akan melewati membran dan lolos ke bawah. Terjadinya proses pemekatan dan pemurnian mengakibatkan peningkatan hasil analisis kandungan protein filtrat < 10.000 Da pada ekstrak rumput laut.

Pemisahan Berat Molekul Peptida dengan *Tricine*-SDS-PAGE

Pemisahan berat molekul dilakukan dengan proses elektroforesis menggunakan *Tricine*-SDS-PAGE dengan pewarnaan *Coomassie blue*. Pita peptida yang terdeteksi dapat dilihat pada Gambar 4. Metode *Tricine*-SDS-PAGE optimal untuk pemisahan peptida terutama dengan berat molekul 1.000 sampai 20.000 Da (Schägger & Jagow, 1987; Schägger, 2006). Metode *Tricine*-SDS-PAGE telah banyak dilakukan sebelumnya terutama untuk pemisahan peptida dengan *taste-active* dan peptida dengan kemampuan bioaktif pada bahan makanan seperti daging sapi (Claeys et al., 2004; Mikami et al., 1999; Tajima & Ito, 1999) dan rumput laut (Wu et al., 2017; Indumathi & Metha, 2016). Kedua jenis peptida tersebut memiliki berat molekul yang



Gambar 1. Pemisahan Berat Molekul Peptida dengan *Tricine*-SDS-PAGE. (R) ekstrak metode WSE Reflux MW < 10.000 Da, (U) ekstrak metode WSE Ultrasound MW < 10.000 Da, (M1) Marker Precision Plus Protein Dual Xtra Standards 2.000 – 250.000 Da (Bio-Rad), (M2) Marker Ultra Low Range Molecular Weight Marker 1.060 – 26.600 Da (SIGMA)

Figure 1. Separation of Molecular Weights using *Tricine*-SDS-PAGE. (R) WSE Reflux method extract MW $< 10,000$ Da, (U) WSE Ultrasound method extract MW $< 10,000$ Da, (M1) Marker Precision Plus Protein Dual Xtra Standards 2,000 – 250,000 Da (Bio-Rad), (M2) Ultra Low Marker Range Molecular Weight Marker 1,060 – 26,600 Da (SIGMA)

rendah yaitu kurang dari 3.000 Da untuk peptida *taste-active* (Zhao et al., 2019; Rhyu & Kim, 2011) dan kurang dari 30.000 Da untuk peptida bioaktif (Cermeño et al., 2020).

Pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE menunjukkan terdapat perbedaan susunan berat molekul peptida pada hasil WSE *reflux* dan *ultrasound*, meskipun kandungan protein ekstrak *S. aquifolium* yang didapatkan dari proses WSE *reflux* dan *ultrasound* tidak jauh berbeda. Metode WSE *reflux* menghasilkan peptida dengan berat molekul yang lebih rendah dibandingkan dengan metode WSE *ultrasound* (Tabel 2). Hal ini dikarenakan proses pemanasan saat WSE *reflux* meningkatkan terbentuknya komponen peptida dari pemecahan protein (Ikeda, 2002; Hartley et al., 2019). Mekanisme reaksi pemecahan protein menjadi peptida terjadi pada proses pemanasan dengan air bersuhu tinggi. Peptida dengan berat molekul berkisar 1.500 sampai 8.300 Da dapat diperoleh dari terpecahnya protein melalui perlakuan hidrotermal tanpa penambahan katalis asam atau basa. Proses pemecahan disebabkan oleh proses hidrolisis protein yang mekanismenya bergantung pada sifat hidrofilisitas asam amino yang ditentukan oleh struktur kimia rantai samping dalam polimer (Aida et al., 2017). Dalam penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Powell et al. (2016), dekomposisi protein BSA terjadi pada ikatan ASP-X dan GLU-X dalam kondisi hidrotermal. Reaktivitas hidrolisis yang tinggi pada ikatan ASP-X dan GLU-X disebabkan oleh struktur kimia rantai samping keduanya yang memiliki struktur asam karboksilat.

Proses WSE *ultrasound* tidak terjadi proses pemanasan. Ekstraksi dengan metode *ultrasound* terjadi dengan mengubah gelombang suara menjadi energi mekanik untuk merusak dinding sel. Kerusakan dinding sel terjadi akibat fenomena kavitasi akustik yang menyebabkan ledakan gelembung udara yang mengakibatkan turbulensi mikro (Cermeño et al., 2020). Meskipun proses WSE *ultrasound* tidak melibatkan proses pemanasan, namun peptida yang dihasilkan juga memiliki berat molekul dibawah 2.000 Da (Gambar 4) yang berarti metode WSE *ultrasound* juga berhasil dalam memecah protein menjadi peptida dengan berat molekul yang kecil.

Secara keseluruhan, pita peptida yang teridentifikasi memiliki ketebalan pita yang rendah dibandingkan dengan ketebalan pita pada marker peptida. Hal ini dapat dipengaruhi oleh konsentrasi peptida yang rendah pada kedua jenis ekstrak

rumput laut. Hal ini sesuai dengan penelitian Baharuddin et al. (2021) bahwa ketebalan pita yang terbentuk menunjukkan banyaknya protein/peptida yang memiliki berat molekul yang sama, sehingga apabila terbentuk pita yang tebal berarti terdapat akumulasi molekul dengan muatan dan ukuran yang sama pada pita yang sama atau berdekatan dan begitu pula sebaliknya. Selain itu, adanya kemungkinan peptida yang keluar dari gel (*diffusing out*) saat proses pewarnaan dan *destaining* karena berat molekul peptida yang kecil.

Identifikasi Profil Peptida secara *In Silico*

Identifikasi profil peptida hasil pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE dilakukan secara *in silico* menggunakan *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 (The UniProt Consortium, 2015). Penelitian ini mengidentifikasi profil rantai peptida (*sequence*) dengan mengintegrasikan berat molekul peptida yang didapatkan dari hasil pemisahan *Tricine*-SDS-PAGE yang paling mendekati dengan berat molekul peptida dari *database* UniProtKB genus *Sargassum* sp.

Susunan rantai peptida (*sequence*) yang diperoleh dari kedua hasil ekstraksi WSE *reflux* dan *ultrasound* dapat dilihat pada Tabel 2. Peptida dengan berat molekul 1.019 Da diprediksi memiliki rantai peptida DFVEVPTGSN yang merupakan data dari *database* UniProtKB dengan berat molekul 1.064 Da. Rantai peptida DFVEVPTGSN dimiliki oleh organisme *Carpophyllum plumosum* yang merupakan spesies rumput laut cokelat dengan nama asli (*original name*) *Sargassum plumosum* A. Richard, 1832 (Guiry & Guiry, 2023a), 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 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 (Guiry & Guiry, 2023c). Selain itu, peptida dengan berat molekul 1.195 Da diprediksi memiliki rantai peptida MRLTQGCFSF dengan berat molekul 1.189

Tabel 2. Profil Peptida Ekstrak berdasarkan Analisis in Silico Database UniProtKB

Table 2. Peptide Profile based on in Silico Analysis from Database UniProtKB

Metode WSE/ WSE Method	Ulangan	Berat Molekul/ Molecular Weight (Da)	Profil Peptida*/ Peptide Profile*	Rantai Peptida/ Sequence
Reflux	1	1019	Subunit besar ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase/oksigenase/ <i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	DFVEVPTGSN
	2	673	-	-
	3	797	-	-
Ultrasound	1	1408	Subunit besar ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase/oksigenase/ <i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	DTPDFVEVATESP
	2	1195	Subunit kecil ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase/oksigenase/ <i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit</i>	MRLTQGCF SF
	3	1019	Subunit besar ribulosa-1,5-bifosfat karboksilase/oksigenase/ <i>Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit</i>	DFVEVPTGSN

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

Alanine (A), Cysteine (C), Aspartic Acid (D), Glutamic Acid (E), Phenylalanine (F), Glycine (G), Histidine (H), Isoleucine (I), Lysine (K), Leucine (L), Methionine (M), Asparagine (N), Proline (P), Glutamine (Q), Arginine (R), Serine (S), Threonine (T), Valine (V), Tryptophan (W), Tyrosine (Y)

*) The type of peptide is determined from the molecular weight of the peptide resulting from *Tricine*-SDS-PAGE separation which is close to the molecular weight in UniProtKB database

Da. Rantai peptida MRLTQGCF SF dimiliki oleh organisme *Sargassum ilicifolium* yang termasuk dalam genus *Sargassum* sp. dan memiliki nama lain *Sargassum ilicifolium* (Turner) C. Agardh, 1820 (Guiry & Guiry, 2023b).

Terdapat dua 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*. Hal ini mungkin disebabkan adanya keterbatasan data yang terdapat pada *database* UniProtKB. Berdasarkan *database* UniProtKB, ukuran berat molekul peptida terkecil yang terdapat pada genus *Sargassum* sp. dan *Sargassum aquifolium* adalah 955 Da, yang menunjukkan adanya kemungkinan bahwa peptida dengan berat molekul lebih rendah belum tercakup dalam *database* tersebut. Ketersediaan informasi pada *database* UniProtKB

terus berkembang seiring dengan ditemukannya jenis protein baru dan penelitian yang terus bertambah, sehingga peptida-peptida tersebut mungkin akan teridentifikasi di pembaruan *database* mendatang.

Berdasarkan analisis *in silico* dengan *database* UniProtKB, berat molekul peptida yang teridentifikasi pada ekstrak rumput laut WSE *reflux* dan *ultrasound* merupakan *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* dengan subunit besar dan kecil. Enzim ini lebih dikenal dengan sebutan RuBisCO merupakan enzim metabolisme yang berperan dalam fiksasi karbon dioksida dalam siklus Calvin dan fotorespirasi dengan bergantung pada afinitasnya terhadap karbon dioksida atau oksigen (Udenigwe et al., 2017). RuBisCO terdapat pada organisme autotropik termasuk alga (mikroalga dan makroalga), bakteri (bakteri fotosintetik dan

bakteri *chemoautotrophic*), *cyanobacteria*, dan tanaman (Udenigwe et al., 2017). Dalam penelitian sebelumnya oleh Kose (2021) telah dilakukan analisis aktivitas bioaktif RuBisCO subunit besar dari *edible seaweed* secara *in silico* menggunakan *database* BIOPEP dan diketahui bahwa peptida RuBisCO dari rumput laut dapat menjadi komponen menjanjikan untuk pengembangan DPP-IV, penghambat ACE, dan aktivitas antioksidan.

Prediksi *Taste-active* Potensial dari Peptida Teridentifikasi

Peptida yang berasal dari makanan tidak hanya diteliti berdasarkan aktivitas biologisnya tetapi juga dapat dianalisis secara spesifik komposisi asam aminonya yang memiliki sifat sensorik (Iwaniak et al., 2016b; Poojary et al., 2017). *Database* BIOPEP dapat memberikan informasi dan mampu memprediksi potensi aktivitas sensorik potensial atau *taste-active* potensial dari substrat rantai peptida melalui proses proteolisis menggunakan berbagai jenis enzim (Minkiewicz et al., 2008; Iwaniak et al., 2016a; Iwaniak et al., 2016b). Dalam penelitian ini dilakukan tiga tahapan analisis yaitu 1) analisis profil *taste-active* potensial, 2) analisis frekuensi kemunculan fragmen sensorik dalam urutan rantai peptida, dan 3) analisis *taste-active* potensial dari peptida hasil proses proteolisis.

Profil *Taste-active* Potensial Peptida

Berdasarkan analisis *taste-active* potensial, diketahui bahwa rantai peptida DFVEVPTGSN memiliki *taste-active* potensial *umami*. Hal ini berdasarkan keberadaan adanya asam amino aspartat (D) yang berada pada susunan 1-1 dan glutamat (E) pada 4-4, serta peptida *umami* EV yang berada pada susunan 4-5 dan peptida VE pada susunan 3-4. Selain rasa *umami*, hasil analisis *taste-active* potensial juga menunjukkan ada potensi kemunculan jenis rasa lain seperti rasa pahit, asam, manis, dan asin. Prediksi *taste-active* potensial pada rantai peptida DTPDFVEVATESP menghasilkan *taste-active* potensial rasa *umami* yang lebih dominan yang diperoleh dari asam amino *umami* yaitu aspartat (D) pada rantai 1-1 dan 4-4, asam glutamat (E) pada rantai 7-7 dan 11-11. Selain itu juga terdapat kandungan peptida dengan rasa *umami* yaitu peptida ES (11-12), EV (7-8), TE (10-11), dan VE (6-7). Selain itu, peptida DTPDFVEVATESP juga memiliki potensial sensorik rasa pahit, asam, manis, dan sedikit asin. Hasil analisis *in silico* pada rantai peptida MRLTQGCFSF juga menunjukkan prediksi *taste-active* potensial yang paling dominan adalah rasa pahit. Hal ini dapat

dilihat dari hasil analisis *taste-active* potensial bahwa peptida MRLTQGCFSF terdiri dari asam amino yang memiliki rasa pahit seperti fenilalanin (F), leusin (L), arginin (R), dan peptida RL yang merupakan susunan peptida dari asam amino arginin (R) dan leusin (L). Peptida dengan kemampuan *taste-active* dikelompokkan berdasarkan afinitasnya terhadap air yaitu asam amino hidrofilik seperti asam aspartat (D), glutamat (E), lisin (K), arginin (R), dan glisin (G) yang memberikan pengaruh rasa asin, asam, *umami*, *astringent*, dan *suppressing bitterness* (Kęska & Stadnik, 2017), sedangkan asam amino dengan sifat hidrofobik yaitu fenilalanin (F), prolin (P), valin (V), leusin (L) triptofan (W), dan alanin (A) berkaitan dengan rasa pahit dan manis. Selain dipengaruhi oleh kelarutannya terhadap air, bentuk dan keberadaan asam amino juga berpengaruh signifikan terhadap *taste-active* yang ditimbulkan (Solms, 1969; Kęska & Stadnik, 2017). Hal inilah yang dapat menjelaskan bahwa *taste-active* potensial yang berbeda pada asam amino yang sama.

Aktivitas sensori dari peptida dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi fisikokimia terutama pH, kondisi panelis saat kegiatan sensori, dan sifat kelarutan asam amino. Kemampuan sensorik panelis dapat dipengaruhi oleh berbagai aspek seperti status kesehatan, termasuk potensi alergi terhadap jenis makanan, pengalaman dalam evaluasi sensorik sebelumnya, kemampuan dalam menjelaskan sensasi sensorik, dan konsentrasi selama pengujian sensorik (Murray et al., 2001), sehingga sangat diperlukan panelis sensorik terlatih untuk menghasilkan evaluasi yang objektif dari berbagai sifat sensorik makanan (Djekic et al., 2021). Kondisi panelis juga dapat mempengaruhi hasil identifikasi rasa dari asam amino dan peptida yang dapat disebabkan oleh perbedaan pendapat mengenai sensasi rasa yang dirasakan (Iwaniak et al., 2016b). Satu jenis asam amino dapat memiliki beberapa nomor identitas (*ID number*) dalam *database* BIOPEP yang dikelompokkan berdasarkan sifat sensorisnya yang muncul pada pH tertentu. Kegiatan sensori yang tercantum dalam *database* BIOPEP dikelompokkan menjadi lima rasa yaitu manis, asam, asin, pahit, dan *umami* yang diperoleh dari panelis sensori.

Frekuensi Kemunculan Fragmen Sensorik dari Urutan Rantai Peptida

Rantai peptida DFVEVPTGSN secara keseluruhan memiliki frekuensi kemunculan fragmen sensorik potensial dengan rasa pahit lebih tinggi dibandingkan dengan rasa yang lain, diikuti dengan

rasa manis, *umami*, dan asam. Kemunculan rasa pahit, manis, dan *umami* memiliki frekuensi lebih tinggi dikarenakan ketiga rasa tersebut merupakan rasa yang paling utama dipengaruhi oleh peptida (Temussi, 2011; Iwaniak et al., 2016a), sedangkan rasa asin dan asam dari peptida berhubungan dengan *zwitterionic* atau sifat dari rantai samping asam amino (Temussi, 2011; Iwaniak et al., 2016a). Selain itu, adanya kemungkinan muncul *taste-active* potensial rasa yang berbeda pada jenis asam amino atau peptida yang sama. Hal ini dikarenakan bentuk dan keberadaan asam amino juga berpengaruh signifikan terhadap *taste-active* yang ditimbulkan, seperti bentuk L- dari fenilalanin, leusin, dan tripsin menimbulkan rasa pahit, sedangkan bentuk D- dari asam amino ini dapat menghasilkan rasa manis yang kuat daripada rasa pahit (Solms, 1969; Kęska & Stadnik, 2017).

Frekuensi kemunculan fragmen sensorik dari rantai peptida DTPDFVEVATESP menghasilkan nilai A yang sama pada rasa *umami* dan pahit, kemudian rasa asam, rasa manis, dan rasa asin. Rasa *umami* dan rasa pahit memiliki frekuensi kemunculan fragmen yang sama besarnya dikarenakan rantai peptida DTPDFVEVATESP memiliki peptida EV dan VE, yang masing-masing memiliki potensial sensorik rasa pahit dan *umami* dalam satu jenis peptida yang sama. Hal ini dapat dipengaruhi oleh bentuk dan keberadaan asam amino dalam kedua peptida tersebut, seperti bentuk L- dan bentuk D- dari asam amino yang berpengaruh signifikan terhadap *taste-active* yang ditimbulkan (Solms, 1969; Kęska & Stadnik, 2017). Rasa *umami* juga dipengaruhi oleh adanya asam amino aspartat (D), glutamat (E), peptida ES dan TE yang memiliki rasa *umami*.

Berdasarkan analisis mengenai frekuensi kemunculan fragmen sensorik, peptida MRLTQGCFSF hanya memiliki frekuensi kemunculan fragmen rasa pahit, manis, dan rasa penekan pahit (*bitterness suppressing*). Frekuensi kemunculan dari fragmen sensorik menunjukkan rasa pahit memiliki nilai A paling tinggi. Kemunculan *taste-active* potensial dari peptida MRLTQGCFSF sesuai dengan pendapat Kęska & Stadnik (2017) yang menunjukkan asam amino penyusun peptida MRLTQGCFSF terdiri dari asam amino leusin (L), metionin (M), arginin (R), dan fenilalanin (F) yang termasuk dalam asam amino yang memiliki *taste-active* rasa pahit dan terdapat asam amino glisin (G) dan serina (S) yang memiliki rasa manis.

***Taste-active* Potensial dari Peptida Hasil Proses Proteolisis**

Dalam penelitian sebelumnya, analisis peptida *taste-active* tidak hanya dilakukan pada bahan makanan yang melalui proses ekstraksi pemanasan dan WSE, melainkan juga dilakukan pada bahan makanan yang melalui proses fermentasi seperti saus kedelai fermentasi dan kecap (Zhu et al., 2020; Oka & Nagata, 1974; Zhuang et al., 2016), keju (Gomez-Ruiz et al., 2007), dan tempe (Amin et al., 2020), dan proses isolasi peptida dengan metode penambahan enzim tertentu untuk diperoleh hidrolisat protein dari bahan pangan (Noguchi et al., 1975; Arai et al., 1972; Zhang et al., 2019b; Su et al., 2012). Sifat sensoris dan fungsi bioaktif peptida sangat bergantung pada struktur rantainya (*sequence*) dan proses proteolisis dapat meningkatkan sifat sensoris dan bioaktif dari peptida. Analisis *in silico* menggunakan *database* dapat digunakan untuk mensimulasikan reaksi proteolitik enzim secara spesifik untuk menghasilkan profil peptida. Salah satu *database* yang paling banyak digunakan untuk proses proteolisis secara *in silico* adalah BIOPEP "*enzyme action*" (Udenigwe, 2014). Beberapa enzim yang kerap digunakan untuk mengisolasi peptida *umami* antara lain enzim protease dengan kondisi pH 7 (Noguchi et al., 1975), enzim pepsin (Arai et al., 1972), enzim protease dan tripsin dengan kondisi pH 6,5 (Zhang et al., 2019b), serta enzim protease dan papain dengan kondisi pH 7 (Su et al., 2011). Oleh karena itu, dalam penelitian ini juga dilakukan analisis karakteristik sensoris dari hasil hidrolisis peptida teridentifikasi menggunakan beberapa jenis enzim tersebut.

Berdasarkan hasil proteolisis secara *in silico* pada Tabel 3 dan Tabel 4 diketahui bahwa hidrolisis rantai peptida DFVEVPTGSN dan DTPDFVEVATESP menggunakan enzim protease pH 7,8 menghasilkan asam amino aspartat (D), hidrolisis menggunakan enzim pepsin menghasilkan peptida dan asam amino yang memiliki dominan rasa *umami*. Kedua asam amino hidrofilik yaitu asam aspartat (D) dan asam glutamat (E) merupakan asam amino yang bertanggungjawab terhadap rasa *umami*. Glutamat terdapat dalam berbagai bahan makanan salah satunya rumput laut dan sebagian besar protein mengandung asam glutamat dengan komposisi yang tinggi. Proses proteolisis yang terjadi selama fermentasi menghasilkan kandungan glutamat bebas yang tinggi (Kurihara, 2015). Dalam penelitian

Tabel 3. Karakteristik Sensori Hidrolisat Peptida DFVEVPTGSN

Table 3. Sensory Characteristics of Peptide Hydrolyzate from DFVEVPTGSN

Protease (pH 7.8)/ Protease (pH 7.8)		Trypsin/ Trypsin		Pepsin/ Pepsin		Papain/ Papain	
Peptida/ Asam amino/ Peptide/Amino acid	Aktivitas Sensori/ Sensory Activity	Peptida/ Asam amino/ Peptide/ Amino acid	Aktivitas Sensori/ Sensory Activity	Peptida/ Asam amino/ Peptide/ Amino acid	Aktivitas Sensori/ Sensory Activity	Peptida/ Asam amino/ Peptide/ Amino acid	Aktivitas Sensori/ Sensory Activity
D	Asam/Sour	-	-	D	Asam/Sour	G	Manis/ Sweet
D	Umami/Umami			D	Umami/Umami		
D	Asin/Salty			D	Asin/Salty		
				F	Pahit/Bitter		
				G	Manis/Sweet		
				VE	Pahit/Bitter		
				VE	Umami/Umami		
				VE	Asam/Sour		
				VE	Umami/Umami		

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)/Alanine (A), Cysteine (C), Aspartic Acid (D), Glutamic Acid (E), Phenylalanine (F), Glycine (G), Histidine (H), Isoleucine (I), Lysine (K), Leucine (L), Methionine (M), Asparagine (N), Proline (P), Glutamine (Q), Arginine (R), Serine (S), Threonine (T), Valine (V), Tryptophan (W), Tyrosine (Y)

Tabel 4. Karakteristik Sensori Hidrolisat Peptida DTPDFVEVATESP

Table 4. Sensory Characteristics of Peptide Hydrolyzate from DTPDFVEVATESP

Protease (pH 7.8)/ Protease (pH 7.8)		Trypsin/Trypsin		Pepsin/Pepsin		Papain/Papain	
Peptida/ Asam amino/ Peptide/Amino acid	Aktivitas Sen- sori/Sensory Activity	Peptida/Asam amino/Peptide/ Amino acid	Aktivitas Sensori/ Sensory Activity	Peptida/Asam amino/Peptide/ Amino acid	Aktivitas Sen- sori/Sensory Activity	Peptida/ Asam amino/ Peptide/Amino acid	Aktivitas Sen- sori/Sensory Activity
D	Asam/ Sour	-	-	D	Asam/Sour	-	-
D	Umami/ Um- ami			D	Umami/ Umami		
D	Asin/ Salty			D	Asin/ Salty		
				E	Asam/ Sour		
				E	Umami/ Umami		
				F	Pahit/ Bitter		
				VA	Pahit/ Bitter		
				VE	Pahit/ Bitter		
				VE	Umami/ Umami		
				VE	Asam/ Sour		
				VE	Umami/ Umami		

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)/Alanine (A), Cysteine (C), Aspartic Acid (D), Glutamic Acid (E), Phenylalanine (F), Glycine (G), Histidine (H), Isoleucine (I), Lysine (K), Leucine (L), Methionine (M), Asparagine (N), Proline (P), Glutamine (Q), Arginine (R), Serine (S), Threonine (T), Valine (V), Tryptophan (W), Tyrosine (Y)

ini, proteolisis secara *in silico* terhadap rantai peptida DFVEVPTGSN dan DTPDFVEVATESP menggunakan enzim tripsin tidak menghasilkan peptida dan asam amino. Hal ini dikarenakan enzim tripsin secara khusus menghidrolisis peptida pada gugus karboksil residu arginin (R) dan lisin (K) (Jellouli et al, 2009), sedangkan kedua gugus tersebut tidak terdapat dalam rantai peptida DFVEVPTGSN dan DTPDFVEVATESP, sehingga pada hasil prediksi proteolisis secara *in silico* tidak menghasilkan peptida dan asam amino. Proses proteolisis tidak hanya menghasilkan asam amino dan peptida yang memiliki potensi rasa *umami*, tetapi juga melepaskan asam amino dengan jenis rasa yang lain seperti rasa pahit berupa fenilalanin (F) dan asam amino dengan rasa manis seperti glisin (G) dalam konsentrasi yang berbeda (Hartley et al., 2019).

Rantai peptida dengan lebih dari 7 residu asam amino memiliki keragaman profil rasa karena kompleksitas dan ketidakhomogenan komposisi dari asam amino. Asam amino aspartat (D) dan glutamat (E) merupakan residu asam amino aktif yang dominan dan keberadaan asam amino tersebut sangat penting karena kontribusinya terhadap rasa *umami* (Wang et al., 2022). Dalam penelitian Choudhury & Sarkar (2017) dan Chaudhari et al. (2009) menyebutkan asam amino bentuk garam dan *ionic* dari asam amino glutamat (E) dan aspartat (D) berkontribusi terhadap rasa *umami* pada rumput laut. 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% (Wang et al., 2022). 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 (1.019 Da) dan DTPDFVEVATESP (1.408 Da) 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) (Winarno, 2008). Hal ini juga membuktikan bahwa penambahan air dalam proses ekstraksi peptida rumput laut dapat menimbulkan *osmotic shock* pada rumput laut sehingga asam amino *umami* (glutamat dan aspartat) yang merupakan komponen hidrofilik dapat larut dalam pelarut air selama proses ekstraksi (Cermefio et al., 2020; Zhao et al., 2019). Selain

itu, *Sargassum aquifolium* termasuk dalam rumput laut cokelat yang diketahui memiliki kandungan protein, asam glutamat, dan asam aspartat yang lebih tinggi dibandingkan dengan rumput laut merah yang memiliki kandungan asam amino yang rendah (Milinovic et al., 2021). Dilihat dari komposisi asam amino, keberadaan asam aspartat (D) pada posisi N-terminal, dan aktivitas sensorik potensial dari peptida yang terkandung menjadikan adanya kemungkinan rasa *umami* dapat ditimbulkan dari kedua peptida tersebut.

Prediksi *Taste-active* Potensial *Kokumi* dari Peptida Teridentifikasi

Peptida dengan *taste-active kokumi* memiliki potensi sebagai komponen bahan penyedap yang berperan dalam menciptakan kompleksitas *mouthfeel* dan berinteraksi sebagai komponen *umami-enhancing* yang dapat mengurangi MSG yang dibutuhkan untuk meningkatkan cita rasa dan kelezatan (Vasilaki et al., 2021), sehingga penelitian dengan upaya mengisolasi peptida *taste-active* penting dilakukan. Pada penelitian ini belum berhasil mengisolasi peptida dengan *taste-active* potensial *kokumi*. Meskipun banyak penelitian yang telah dilakukan untuk mengidentifikasi peptida *taste-active* dengan rasa *kokumi*, sebagian besar penelitian lebih berfokus pada mengidentifikasi susunan rantai peptida daripada pengukuran berat molekul dari peptidanya. Sebagian besar data mengenai peptida *taste-active kokumi* tidak diketahui berat molekul peptidanya (Xu et al., 2018; Pinsorn et al., 2018; Ueda et al., 1990; Kuroda et al., 2013; Shibata et al., 2017; Toelstede & Hofmann, 2009; Hillmann & Hofmann, 2016; Feng et al., 2019; Miyamura et al., 2014; Phewpan et al., 2020; Miyamura et al., 2015; Kuroda et al., 2012; Zhu et al., 2020; Zhang et al., 2019b; Yu et al., 2017). Hal inilah yang menjadi keterbatasan dalam penelitian ini, yang lebih berfokus pada identifikasi peptida berdasarkan berat molekul peptida. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa peptida *taste-active kokumi* memiliki berat molekul peptida kurang dari 2.000 Da yaitu berkisar 1.000 sampai 1.500 Da (Zhang et al., 2019a) bahkan terdapat peptida *kokumi* dengan berat molekul 247 Da (Dunkel et al., 2007). Penelitian ini berhasil mengisolasi peptida dengan ukuran berat molekul kurang dari 1.000 Da yaitu 673 Da dan 797 Da. Kedua peptida ini berpotensi memiliki *taste-active kokumi* dikarenakan berat molekulnya yang kurang dari 1.000 Da, meskipun juga memungkinkan untuk memiliki *taste-active* rasa yang lain dikarenakan

kedua peptida ini belum diketahui susunan rantai peptidanya.

KESIMPULAN

Ekstraksi WSE menggunakan metode *reflux* dan *ultrasound* pada rumput laut *Sargassum aquifolium* menghasilkan peptida dengan berat molekul kurang dari 2.000 Da yang teridentifikasi melalui *Tricine*-SDS-PAGE. Berdasarkan pendekatan *in silico*, peptida tersebut teridentifikasi dengan sekuen DFVEVPTGSN (1.019 Da) dan DTPDFVEVATESP (1.408 Da) yang diprediksi memiliki *taste-active* potensial *umami*. Namun demikian, peptida *taste-active* potensial *kokumi* belum berhasil teridentifikasi dengan pendekatan ekstraksi WSE baik metode *reflux* maupun metode *ultrasound*, serta pendekatan dengan *in silico*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala UR & PM Laboratorium Biomedik Terpadu, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang dan Hibah Riset Rumpun Nutrisi dan Pangan Fungsional Tahun 2022, Program Magister Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang yang telah memfasilitasi dan membantu pendanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Aida, T. M., Oshima, M., & Smith, R. L. (2017). Controlled Conversion of Proteins into High-Molecular-Weight Peptides without Additives with High-Temperature Water and Fast Heating Rates. *American Chemical Society Sustainable Chemistry & Engineering*, 5, 7709-7715. doi: 10.1021/acssuschemeng.7b01146

Amin, M. N. G., Kusnadi, J., Hsu, J.-L., Doerksen, R. J., & Huang, T.-C. (2020). Identification of a novel umami peptide in tempeh (Indonesian fermented soybean) and its binding mechanism to the umami receptor T1R. *Food Chemistry*, 333(2). doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127411

Arai, S., Yamashita, M., & Fujimaki, M. (1972). Glutamyl oligopeptides as factors responsible for tastes of a proteinase-modified soybean protein. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(7), 1253-1256. doi: 10.1080/00021369.1972.10860400

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

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: 1-11. doi: 10.1016/j.foodchem.2023.135925

Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17(5): 447-460. doi: [10.1007/s10811-005-1641-4](https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4)

Belter, P.A., Cussler, E.L. & Hu, W.S. (1988). *Bioseparation Down Stream Processing for Biotechnology*. New York, USA: John Wiley and Sons.

Cermeño, 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

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

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

Claeys, E., De Smet, S., Balcaen, A., Raes, K., & Demeyer, D. (2004). Quantification of fresh meat peptides by SDS-PAGE in relation to ageing time and taste intensity. *Meat Science*, 67, 281-288. doi: 10.1016/j.meatsci.2003.11.001

Dewi, E. N., Amalia, U., & Mel, M. (2016). The Effect of Different Treatments to the Amino Acid Contents of Micro Algae *Spirulina* sp. *Aquatic Procedia*, 7(2016): 59-65. doi: 10.1016/j.aqpro.2016.07.008

Djekic, I., Lorenzo, J. M., Munekeata, P. E. S., Gagaoua, M. & Tomasevic, I. (2021). Review on characteristics of trained sensory panels in food science. *Journal of Texture Studies*, 1-9. doi: 10.1111/jtxs.12616

Dunkel, A., Koster, J., & Hofmann, T. (2007). Molecular and sensory characterization of gamma-glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6712-6719. doi: 10.1021/jf071276u

Dziuba, M., Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. (2003). Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. *Polimery*, 48(1), 50-53. Retrieved from <https://polimery.ichp.vot.pl/index.php/p/article/view/1836>

Feng, T., Wu, Y., Zhang, Z., Song, S., Zhuang, H., Xu, Z., Yao, L., & Sun, M. (2019). Purification, Identification, and Sensory Evaluation of Kokumi Peptides from *Agaricus bisporus* Mushroom. *Foods*, 8(43), 1-12. doi: 10.3390/foods8020043

Gomez-Ruiz, J. A., Taborda, G., Amigo, L., Ramos, M., & Molina, E. (2007). Sensory and mass spectrometric analysis of the peptidic fraction lower than one thousand daltons in Manchego Cheese. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 4966-4973. doi: 10.3168/jds.2007-0350

- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2023a). 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. World Register of Marine Species. Retrieved from <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=373349> on 12 October 2023.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2023b). 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. World Register of Marine Species. Retrieved from <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=211937> on 12 October 2023.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2023c). 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. World Register of Marine Species. Retrieved from <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=494874> on 12 October 2023.
- Hakimi, S., Kari, N. M., Ismail, N., Ismail, M. N., & Ahmad, F. (2022). Evaluation of taste active peptides and amino acids from anchovy proteins in fish sauce by in silico approach. *Food Science and Biotechnology*, 31: 767-785. doi: 10.1007/s10068-022-01097-w
- Harnedy, P. & FitzGerald, R. (2013). Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1): 375–382. doi: 10.1016/j.lwt.2012.09.023.
- Hartley, I. E., Liem, D. G., & Keast, R. (2019). Umami as an 'Alimentary' Taste. A New Perspective on Taste Classification. *Nutrients*, 11(1), 1–18. doi: 10.3390/nu11010182
- Hillmann, H., & Hofmann, T. (2016). Quantitation of Key Tastants and Reengineering the Taste of Parmesan Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(8), 1794-1805. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00112
- Ikedu, K. (2002). New Seasonings. *Chemical Senses*, 27(9), 847–849. doi: 10.1093/chemse/27.9.847
- Indumathi, P., & Metha, A., J. (2016). A novel anticoagulant peptide from the Nori hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 20, 606-617. doi: 10.1016/j.jff.2015.11.016
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., & Hryniewicz, M. (2016a). 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
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Sieniawski, K., & Starowicz, P. (2016b). BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Research International*, 85, 155-161. doi: 10.1016/j.foodres.2016.04.031
- Jellouli, K., Bougatef, A., Daassi, D., Balti, R., Barkia, A., & Nasri, M. (2009). New alkaline trypsin from the intestine of Grey triggerfish (*Balistes capriscus*) with high activity at low temperature: Purification and characterization. *Food Chemistry*, 116, 644-650. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.087
- Joubert, Y., & Fleurence, J. (2008). Simultaneous extraction of proteins and DNA by an enzymatic treatment of the cell wall of *Palmaria palmata* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 20 (1): 55-61. doi: 10.1007/s10811-007-9180-9
- Kadam, S. U., Alvarez, C., Tiwari, B. K., & Donnell, C. P. (2015). Extraction of biomolecules from seaweeds. In: *Seaweed Sustainability*. San Diego, US: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-418697-2.00009-X
- Kadi, A. (2014). Seaweed sebagai produk alami dari perairan Indonesia. *Jurnal Oseana*, 32(3), 31-40. Retrieved from http://oseanografi.lipi.go.id/dokumen/os_xxxix_3_2014-4.pdf
- Kęska, 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
- Kong, Y. Zhang, L. L., Zhao, J. Zhang, Y. Y., Sun, B. G., & Chen, H. T. (2019). Isolation and identification of the umami peptides from shiitake mushroom by consecutive chromatography and LC-Q-TOF-MS. *Food Research International*, 121, 463-470. doi: 10.1016/j.foodres.2018.11.060
- 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
- Kurihara, K. (2015). Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor. *BioMed Research International*, 2015, 1-10. doi: 10.1155/2015/189402
- Kuroda, M., Kato, Y., Yamazaki, J., Kai, Y., Mizukoshi, T., Miyano, H., & Eto, Y. (2012). Determination and Quantification of γ -Glutamyl-valyl-glycine in Commercial Fish Sauces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7291-7296. doi: 10.1021/jf3012932
- Kuroda, M., Kato, Y., Yamazaki, J., Kai, Y., Mizukoshi, T., Miyano, H., & Eto, Y. (2013). Determination and quantification of the *Kokumi* peptide, γ -Glutamyl-valyl-glycine, in commercial soy sauces. *Food Chemistry*, 141(2), 823-828. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.070
- 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(2), 278-287. doi: 10.1016/0003-2697(85)90511-1.
- 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*, 1-12. doi: 10.1080/10408398.2020.1837726
- 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*, 312. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126053
- 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*, 330. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127204
- 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
- Mikami, M., Sekikawa, M., & Shimada, K. (1999). Changes in peptides during conditioning of three type of beef samples. *Proceedings of the 45th International Congress of Meat Science and Technology*, 288-289. Yokohama, Japan.
- Milinic, J., Mata, P., Diniz, M., & Noronha, J. P. (2021). Umami taste in edible seaweeds: The current comprehension and perception. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 23, 1-9. doi: 10.1016/j.ijgfs.2020.100301
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Iwaniak, A., Dziuba, M., & Darewicz, M. (2008). BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *Journal of AOAC International*, 91 (4), 965-980. doi: 10.1093/jaoac/91.4.965
- Miyamura, N., Kuroda, M., Kato, Y., Yamazaki, J., Mizukoshi, T., Miyano, H., & Eto, Y. (2014). Determination and Quantification of a *Kokumi* Peptide, γ -Glutamyl-Valyl-Glycine, in Fermented Shrimp Paste Condiments. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 699-703. doi: 10.3136/fstr.20.699
- 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*, 120(3), 311-314. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.01.018
- Murray, J., Delahunty, C., & Baxter, I. (2001). Descriptive sensory analysis: Past, present, and future. *Food Research International*, 34(6), 461-471. doi: 10.1016/S0963-9969(01)00070-9
- Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 463, 73-95. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- Noguchi, M., Arai, S., Yamashita, M., Kato, H., & Fujimaki, M. (1975). Isolation and identification of acidic oligopeptides occurring in a flavor-potentiating fraction from a fish protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(1), 49-53. doi: 10.1021/jf60197a003
- Oka, S., & Nagata, K. (1974). Isolation and characterization of acidic peptides in soy sauce. *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(6), 1195-1202. doi: 10.1080/00021369.1974.10861306
- 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
- Pereira, L. (2011). *A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. Seaweed: ecology, nutrient composition and medical uses*. USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Pereira, L. (2016). *Edible Seaweeds of the World*. USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.
- Phewpan, A., Phuwaprisirisan, P., Takahashi, H., Ohshima, C., Ngamchuachit, P., Techaruvichit, P., Dirndorfer, S., Dawid, C., Hofmann, T., & Keeratipibul, S. (2020). Investigation of Kokumi Substances and Bacteria in Thai Fermented Freshwater Fish (Pla-ra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(38), 10345-10351. doi: 10.1021/acs.jafc.9b06107
- Pinsorn, P., Oikawa, A., Watanabe, M., Sasaki, R., Ngamchuachit, P., Hoefgen, R., Saito, K., & Sirikantaramas, S. (2018). Metabolic Variation in the Pulp of Two Durian Cultivars: Unraveling the Metabolites that Contribute to the Flavor. *Food Chemistry*, 268, 118-125. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.06.066
- Poojary, M. M., Orlin, V., Passamonti, P., & Olsen, K. (2017). Improved extraction methods for simultaneous recovery of umami compounds from six different mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 171-183. doi: 10.1016/j.jfca.2017.08.004
- Powell, T., Bowra, S., & Cooper, H. J. (2016). Subcritical Water Processing of Proteins: An Alternative to Enzymatic Digestion?. *Analytical Chemistry*, 88, 6425-6432. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01013
- 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
- Pratiwi, A. R., Yonata, D., Meiliana, & Ananingsih, V. K. (2020). Metode Pembuatan Penyedap Rasa Berbahan Ganggang *Sargassum aquifolium*, Paten Indonesia. S00202009231
- 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.
- Rhyu, M. R., & Kim, E. Y. (2011). Umami taste characteristics of water extract of *Doenjang*, a Korean soybean paste: Low-molecular acidic peptides may be possible clue to the taste. *Food Chemistry*, 127, 1210-1215. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.128
- 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
- Salger, M., Stark, T. D., & Hofmann, T. (2019). Taste modulating peptides from overfermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(15), 4311-4320. doi: 10.1021/acs.jafc.9b00905.

- Schägger, H. (2006). Protocol: Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16-22. doi: 10.1038/nprot.2006.4
- 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
- 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
- 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*, 81(11), 2168-2177. doi: 10.1080/09168451.2017.1372179
- Solms, J. (1969). Taste of amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17 (4): 686-688. doi: 10.1021/jf60164a016
- Su, G., Chi, C., Zheng, L., Yang, B., Ren, J., & Zhao, M. (2012). Isolation and identification of two novel umami and umami-enhancing peptides from peanut hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS. *Food Chemistry*, 135(2), 479-485. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.130
- Su, G., Ren, J., Yang, B., Cui, C., & Zhao, M. (2011). Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from *Aspergillus oryzae* and commercial proteases. *Food Chemistry*, 126, 1306-1311. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.083
- Suzuki, H., Nakafuji, Y., & Tamura, T. (2017). New Method to Produce Kokumi Seasoning from Protein Hydrolysates Using Bacterial Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(48), 10514-10519. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03690
- Tajima, M., & Ito, T. (1999). Change in polypeptides in beef soup stock during simmering. *Proceedings of the 45th International Congress of Meat Science and Technology*, 186-187, Yokohama, Japan.
- Temussi, P. A. (2011). The good taste of peptides. *Journal of Peptide Science*, 18, 73-82. doi: 10.1002/psc.1428
- The UniProt Consortium. (2015). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43, D204-D212. doi: 10.1093/nar/gku989
- Toelstede, S., & Hofmann, T. (2009). Kokumi-Active Glutamyl Peptides in Cheeses and Their Biogeneration by *Penicillium roquefortii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3733-3748. doi: 10.1021/jf900280j
- 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
- 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
- Ueda, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R., & Kimizuka, A. (1990). Characteristic Flavor Constituents in Water Extract of Garlic. *Agriculture and Biological Chemistry*, 54(1), 163-169. doi: 10.1080/00021369.1990.10869909
- Vasilaki, A., Panagiotopoulou, E., Koupantsis, T., Katsanidis, E., & Mourtzinis, I. (2021). Recent insights in flavor-enhancers: Definition, mechanism of action, taste-enhancing ingredients, analytical techniques and the potential of utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. doi: 10.1080/10408398.2021.1939264
- 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
- Waterborg, J. H. (2009). *The Lowry method for protein quantitation*. In: Walker, J. M. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*, New York, USA: Human Press.
- Winarno, F. G. (2008). *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta, Indonesia: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Wu, Q., Cai, Q. F., Yoshida, A., Sun, L. C., Liu, Y. X., Liu, G. M., Su, W. J., & Cao, M. J. (2017). Purification and characterization of two novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from R-phycoerythrin of red algae (*Bangia fusco-purpurea*). *European Food Research and Technology*, 243(5), 779-789. doi: 10.1007/s00217-016-2792-z
- Xu, X., You, M., Song, H., Gong, L., & Pan, W. (2018). Investigation of umami and kokumi taste-active components in bovine bone marrow extract produced during enzymatic hydrolysis and Maillard reaction. *International Journal of Food Science and Technology*, 53(11), 2465-2481. doi: 10.1111/ijfs.13893
- Yamasaki, Y., & Maekawa, K. (1978). A peptide with delicious taste. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(9), 1761-1765. doi: 10.1080/00021369.1978.10863242
- Yu, X., Zhang, L., Miao, X., Li, Y., & Liu, Y. (2017). The structure features of umami hexapeptides for the T1R1/T1R3 receptor. *Food Chemistry*, 221(15), 599-605. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.133
- Zhang, J. A., Sun-Waterhouse, D., Su, G. W., & Zhao, M. (2019a). New insight into umami receptor, umami/umami-enhancing peptides and their derivatives: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 429-438. doi: 10.1016/j.tifs.2019.04.008
- Zhang, Y., Ma, Y., Ahmed, Z., Geng, W., Tang, W., Liu, Y., Jin, H., Jiang, F., Wang, J., & Wang, Y. (2019b). Purification and identification of kokumi-enhancing peptides from chicken protein hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 2151-2158. doi: 10.1111/ijfs.14122
- Zhang, Y., Venkatasamy, C., Pan, Z., Liu, W., & Zhao, L. (2017). Novel Umami Ingredients: Umami Peptides and Their Taste. *Journal of Food Science*, 82(1), 16-

23. doi: 10.1111/1750-3841.13576
- Zhang, M. X., Wang, X. C., Liu, Y., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2012). Isolation and identification of flavour peptides from Puffer fish (*Takifugu obscurus*) muscle using an electronic tongue and MALDI-TOF/TOF MS/MS. *Food Chemistry*, 135, 1463-1470. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.026
- Zhao, W., He, J., Yu, Z., Wu, S., Li, J., Liu, J., & Liao, X. (2022). *In silico* identification of novel small molecule umami peptide from ovotransferin. *International Journal of Food Science Technology*, 57(5), 2628-2635. doi: 10.1111/IJFS.15166
- 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. doi: 10.1016/j.tifs.2019.09.012.
- Zhu, X., Sun-Waterhouse, D., Chen, J., Cui, C., & Wang, W. (2020). Comparative study on the novel umami-active peptides of the whole soybeans and the defatted soybeans fermented soy sauce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(1), 158-166. doi: 10.1002/jsfa.10626
- Zhuang, M., Zhao, M., Lin, L., Dong, Y., Chen, H., Feng, M., Sun-Waterhouse, D., & Su, G. (2016). Macroporous resin purification of peptides with umami taste from soy sauce. *Food Chemistry*, 190, 338-344. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.105