



# **KARAKTERISASI METABOLIT BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI POSBIOTIK: PEPTIDA BIOAKTIF DAN ASAM LEMAK RANTAI PENDEK PADA YOGURT HASIL PROSES TERMAL**

**MILKA SULISTIAWATI**



**PROGRAM STUDI MAGISTER TEKNOLOGI PANGAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2025**



### @Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Karakterisasi Metabolit Bakteri Asam Laktat sebagai Posbiotik: Peptida Bioaktif dan Asam Lemak Rantai Pendek pada Yogurt Hasil Proses Termal” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

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

Bogor, Januari 2025

Milka Sulistiawati  
F2502221019

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### @Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## RINGKASAN

MILKA SULISTIAWATI. Karakterisasi Metabolit Bakteri Asam Laktat sebagai Posbiotik: Peptida Bioaktif dan Asam Lemak Rantai Pendek pada Yogurt Hasil Proses Termal. Dibimbing oleh NURHENI SRI PALUPI dan LILIS NURAIDA.

Posbiotik adalah mikroorganisme mati dan/atau komponen metabolitnya yang dapat memberikan manfaat kesehatan pada inangnya. Kestabilan produk pada proses produksi maupun penyimpanan merupakan salah satu faktor yang mendorong minat dalam pengembangan posbiotik. Stabilitas posbiotik terjaga karena kondisi mikroorganisme yang sudah inaktif, sehingga lebih tahan terhadap pengaruh suhu dan keberadaan oksigen. Penggunaan posbiotik pada produk yogurt menjadi penting untuk pemasaran di daerah yang tidak memiliki sistem distribusi dingin yang memadai.

Posbiotik dapat diidentifikasi sebagai sel utuh mati, fragmen dinding sel, asam lemak rantai pendek (SCFA), asam amino, enzim, peptida bioaktif, eksopolisakarida (EPS), dan vitamin yang dihasilkan dari proses fermentasi. Salah satu proses untuk memperoleh posbiotik adalah menggunakan proses termal yang dapat memengaruhi struktur fisiko-kimia dan kualitas posbiotik. Proses termal pada sampel yogurt berpotensi untuk menambah keragaman komponen peptida bioaktif dan meningkatkan kadar SCFA. Proses termal juga dapat memengaruhi bioaktivitas peptida bioaktif dengan meningkatkan beberapa aktivitas biologis.

Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi efek proses termal terhadap komponen peptida bioaktif dan SCFA serta mengidentifikasi potensi manfaat kesehatan peptida bioaktif pada yogurt secara *in silico*. Yogurt yang difermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, kemudian diaplikasikan proses termal yang dilakukan dengan pemanasan sampel dalam kemasan pada suhu 78 °C selama 15 menit. Analisis peptida bioaktif dilakukan menggunakan LC-HRMS, sementara bioaktivitas dievaluasi dengan metode *in silico* menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM. Evaluasi efek proses termal pada peptida bioaktif dan SCFA dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sebelum dan setelah proses termal.

Proses termal pada yogurt dapat meningkatkan keragaman peptida bioaktif dengan berat molekul rendah. Bioaktivitas dominan secara *in silico* setelah proses termal menghasilkan empat bioaktivitas dominan yaitu *Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitor*, *dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitor*, *dipeptidyl peptidase (DPP) III inhibitor*, dan *antioxidative*. Evaluasi manfaat kesehatan secara *in silico* yang dilakukan dengan mengidentifikasi fragmen bioaktif dan potensi aktivitas biologis menunjukkan bahwa bioaktivitas yang paling dominan adalah *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*. Proses termal juga menghasilkan tiga peptida bioaktif baru yang berkontribusi terhadap aktivitas *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*. Proses termal juga dapat meningkatkan SCFA, khususnya asetat dan butirat, pada yogurt.

**Kata kunci:** asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acid* - SCFA), *in silico*, peptida bioaktif, posbiotik, proses termal



## SUMMARY

MILKA SULISTIAWATI. Characterization of Lactic Acid Bacteria Metabolites as Postbiotics: Bioactive Peptides and Short-Chain Fatty Acids on Yogurt with Thermal Process Inactivation. Supervised by NURHENI SRI PALUPI and LILIS NURAIIDA.

Postbiotics are dead microorganisms and/or their metabolite components that can provide health benefits to the host. Product stability during production and storage is a key factor driving interest in the development of postbiotics. Postbiotic stability is maintained because the microorganisms are inactive, making them more resistant to the effects of temperature and oxygen exposure. The use of postbiotics in yogurt products becomes significant for marketing in regions without adequate cold-chain distribution systems.

Postbiotics can be identified as inactivated whole cells, cell wall fragments, short-chain fatty acids (SCFAs), amino acids, enzymes, bioactive peptides, exopolysaccharides (EPS), and vitamins produced during fermentation. One method to obtain postbiotics is thermal processing, which can influence the physicochemical structure and quality of postbiotics. Thermal processing in yogurt samples has the potential to increase the diversity of bioactive peptide components and enhance SCFA levels. It can also affect the bioactivity of bioactive peptides by boosting certain biological activities.

The research aims to evaluate the effects of thermal processing on bioactive peptide components and SCFAs and to identify the potential health benefits of bioactive peptides in yogurt using *in silico* analysis. The yogurt was fermented using *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, followed by thermal processing through sample heating in packaging at 78°C for 15 minutes. Bioactive peptide analysis was conducted using LC-HRMS, while bioactivity was assessed through *in silico* methods using the BIOPEP-UWM application. The evaluation of thermal processing effects on bioactive peptides and SCFAs was performed by comparing the analysis results before and after the thermal process.

The thermal process applied to yogurt can enhance the diversity of bioactive peptides with low molecular weights. *In silico* analysis following the thermal process identified four dominant bioactivities, Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitor, dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitor, dipeptidyl peptidase (DPP) III inhibitor, and antioxidative. The health benefits assessment conducted *in silico* through the identification of bioactive fragments and their biological activity potential revealed that the most dominant bioactivities were ACE inhibitor and DPP IV inhibitor. The thermal process also generated three new bioactive peptides contributing to ACE inhibitor and DPP IV inhibitor activities. The thermal process increased the levels of SCFAs, particularly acetate and butyrate, in yogurt.

**Keywords:** bioactive peptide, inactivation, *in silico*, postbiotic, short chain fatty acids (SCFAs)



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## © Hak Cipta milik IPB, tahun 2025<sup>1</sup> Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

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

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

---

<sup>1</sup>Pelimpahan hak cipta atas karya tulis dari penelitian kerja sama dengan pihak luar IPB harus didasarkan pada perjanjian kerja sama yang terkait



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

# **KARAKTERISASI METABOLIT BAKTERI ASAM LAKTAT SEBAGAI POSBIOTIK: PEPTIDA BIOAKTIF DAN ASAM LEMAK RANTAI PENDEK PADA YOGURT HASIL PROSES TERMAL**

**MILKA SULISTIAWATI**

Tesis  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister  
Program Studi Teknologi Pangan

**PROGRAM STUDI MAGISTER TEKNOLOGI PANGAN  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2025**



**@Hak cipta milik IPB University**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Judul Tesis

: Karakterisasi Metabolit Bakteri Asam Laktat sebagai  
Posbiotik: Peptida Bioaktif dan Asam Lemak Rantai  
Pendek pada Yogurt Hasil Proses Termal

Nama  
NIM

: Milka Sulistiawati  
: F2502221019

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Prof. Dr. Ir. Nurheni Sri Palupi, M.Si



Pembimbing 2:

Prof. Dr. Ir. Lilis Nuraida, M.Sc



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Dr. Nur Wulandari, S.T.P., M.Si  
NIP 197410032000032001



Dekan Fakultas Teknologi Pertanian:

Prof. Dr. Ir. Slamet Budijanto, M.Agr  
NIP 19610502 198603 1 002



Tanggal Ujian: 9 Januari 2025

Tanggal Lulus: 15 Januari 2025

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan September 2023 sampai bulan Mei 2024 dengan judul “Karakterisasi Metabolit Bakteri Asam Laktat sebagai Posbiotik: Peptida Bioaktif dan Asam Lemak Rantai Pendek pada Yogurt Hasil Proses Termal”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Ibu Prof. Dr. Ir. Nurheni Sri Palupi, M.Si. selaku ketua komisi pembimbing dan Ibu Prof. Dr. Ir. Lilis Nuraida, M.Sc. selaku anggota komisi pembimbing yang telah memberikan banyak masukan, saran dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Dr. Uswatun Hassanah, S.T.P., M.Si selaku penguji luar komisi dan kepada Dr. Nur Wulandari, S.T.P., M.Si selaku pimpinan ujian tesis yang telah memberikan masukan dan saran untuk penyempurnaan penulisan tesis ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh dosen dan staff di Program Studi Magister Teknologi Pangan, serta teknisi Laboratorium Mikrobiologi SEAFAS Center yang telah membantu penulis selama melaksanakan penelitian. Ucapan terima kasih juga diucapkan kepada rekan-rekan kantor yang telah membantu penulis dalam melaksanakan penelitian. Terima kasih yang tak terhingga disampaikan kepada seluruh keluarga yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, serta dukungan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi ini. Kepada teman-teman Pascasarjana TPN 18, terima kasih atas kebersamaan, dukungan, dan pengalaman yang diberikan selama ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Januari 2025

*Milka Sulistiawati*



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	ix
<b>PENDAHULUAN</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.5 Ruang Lingkup Penelitian	3
1.6 Hipotesis Penelitian	4
<b>II TINJAUAN PUSTAKA</b>	<b>5</b>
2.1 Yogurt dan Proses Pembuatannya	5
2.2 Posbiotik dan Komponennya	7
2.3 Proses Inaktivasi	13
2.4 Metode <i>In Silico</i> untuk Identifikasi Bioaktivitas Peptida	14
<b>III METODE</b>	<b>16</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.3 Kerangka / Tahapan Penelitian	16
3.4 Prosedur Analisis	19
3.5 Analisis Data	24
<b>IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	<b>26</b>
4.1 Pengaruh Proses Inaktivasi Termal terhadap Sekuen peptida	26
4.2 Hasil Analisis SCFA dan Pengaruh Proses Pemanasan	38
4.3 Hasil Analisis Proksimat	40
<b>V SIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>42</b>
5.1 Simpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49
RIWAYAT HIDUP	72

## DAFTAR TABEL

1 Bioaktivitas dan peptida bioaktif	12
2 Matriks analisis produk yogurt	19
3 Sekuens peptida sebelum dan setelah proses inaktivasi termal	27
4 Bioaktivitas peptida sebelum dan setelah proses inaktivasi termal	29
5 Bioaktivitas peptida berdasarkan keberadaan fragmen bioaktif	30
6 Frekuensi keberadaan fragmen bioaktif peptida sebelum dan setelah	34
7 Fragmen peptida bioaktif sebagai <i>ACE inhibitor</i> dan <i>DPP IV inhibitor</i>	38
8 Komposisi SCFA pada sampel yogurt	38
9 Komposisi proksimat pada produk yogurt	40

## DAFTAR GAMBAR

1 Tahapan pembuatan produk yogurt dalam kemasan	7
2 Tahapan penelitian dan analisis produk yogurt dalam kemasan	17
3 Tahapan pembuatan produk yogurt dalam kemasan <i>pouch</i>	18
4 Tahapan fraksinasi supernatan	19
5 Bioaktivitas berdasarkan frekuensi keberadaan fragmen bioaktif	34
6 Mekanisme kerja <i>ACE inhibitor</i> dalam pencegahan tekanan darah	35
7 Mekanisme kerja DPP IV inhibitor dalam mengatur kadar glukosa	36
8 Peptida bioaktif pada bioaktivitas dominan	37
9 Komposisi SCFA sebelum dan sesudah proses inaktivasi termal	39
10 Komposisi proksimat produk yogurt sebelum dan setelah proses	41

## DAFTAR LAMPIRAN

1 Potensi bioaktivitas peptida berdasarkan nilai A dan B	50
2 Prosedur Analisis SIG	53
3 Hasil Analisis Proksimat	62
4 Hasil Analisis SCFA	64



### @Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Yogurt dikenal sebagai pangan fermentasi bakteri asam laktat (BAL) yang memberikan manfaat untuk menunjang kesehatan dengan melibatkan BAL. Berdasarkan definisi kategori pangan dari Badan Pengolahan Obat dan Makanan (BPOM), “yogurt berperisa/rasa adalah produk susu yang diperoleh dari fermentasi susu dengan menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, dapat ditambahkan bakteri lain yang sesuai, dengan penambahan perisa/rasa” (BPOM 2023). Dibandingkan dengan beberapa negara seperti Jepang, Korea Selatan, Tiongkok, dan negara-negara Eropa, perkembangan yogurt di Indonesia terbilang lambat. Salah satunya penyebabnya karena kendala pada proses distribusi yang memerlukan suhu dingin (*cold chain distribution*) untuk menjaga agar BAL tetap aktif. Akibatnya biaya yang dibutuhkan untuk proses distribusi menjadi mahal. Selain itu kondisi geografis Indonesia sebagai negara kepulauan menambah kompleksitas untuk distribusi rantai dingin.

Menurut FAO (2002), probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang dapat memberikan manfaat kesehatan kepada inangnya. Namun, beberapa bukti ilmiah menunjukkan bahwa mikroorganisme yang telah mengalami proses inaktivasi juga memiliki potensi untuk memberikan manfaat kesehatan. Berdasarkan hal tersebut, Taverniti dan Guglielmetti (2011) mengusulkan istilah paraprobiotik untuk merujuk pada sel mikroba atau fragmen sel yang telah diinaktivasi namun tetap memberikan manfaat kesehatan. Selain itu, berkembang pula istilah posbiotik, yang didefinisikan sebagai aktivitas metabolit probiotik atau molekul yang dilepaskan yang mampu memberikan efek menguntungkan bagi inang, baik secara langsung maupun tidak langsung (Tsilingiri *et al.* 2011). Pada tahun 2021, *The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) mendefinisikan posbiotik sebagai mikroorganisme mati dan/atau metabolitnya yang dihasilkan melalui proses tertentu, yang dapat memberikan manfaat kesehatan kepada inangnya. Definisi ini mengintegrasikan konsep paraprobiotik dan posbiotik yang sebelumnya memiliki definisi yang berbeda.

Proses fermentasi BAL dapat menghasilkan metabolit yang memberikan manfaat terhadap kesehatan yang dapat berupa fragmen dinding sel, asam lemak rantai pendek (SCFA), asam amino, enzim, peptida bioaktif, eksopolisakarida (EPS), dan vitamin (Germani *et al.* 2014; Zolkiewicz *et al.* 2020; Peredo-Lovillo *et al.* 2022). Berdasarkan definisi posbiotik dari ISAPP, metabolit tersebut merupakan komponen posbiotik. Posbiotik harus memenuhi beberapa kriteria penting, yaitu karakterisasi genom mikroorganisme yang digunakan dalam proses, deskripsi rinci mengenai metode inaktivasi yang diterapkan, serta konfirmasi bahwa proses inaktivasi telah terjadi. Selain itu, diperlukan pembuktian efek kesehatan pada manusia melalui studi klinis terkontrol, penjelasan terperinci mengenai komposisi posbiotik, serta kajian komprehensif terkait keamanan pangan posbiotik (Salminen *et al.* 2021). Berdasarkan kriteria tersebut, maka identifikasi komponen bioaktif pada produk hasil fermentasi BAL menjadi penting untuk menentukan kualitas posbiotik. Pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi komponen bioaktif

khususnya peptida bioaktif dan SCFA pada yogurt hasil fermentasi BAL *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Protein yang berasal dari susu merupakan prekursor dari peptida bioaktif, yang sebagian besar peptida ini bersifat inaktif pada struktur protein utamanya. Peptida dalam bentuk inaktif tidak memiliki manfaat kesehatan dan memerlukan proses lanjutan untuk menjadi bentuk aktifnya (Korhonen dan Pihlanto 2006; Rubak *et al.* 2020; FitzGerald *et al.* 2020). Terdapat beberapa proses untuk mengubah aktivasi peptida, yaitu: (1) proses hidrolisis dengan enzim pencernaan; (2) proses hidrolisis dengan mikroorganisme proteolitik; (3) proses enzimas proteolisis yang berasal dari mikroorganisme; dan (4) proses perubahan fisik/kimia (ultrasonik, *microwave*, penambahan asam/basa). Pada proses fermentasi susu yang melibatkan BAL terjadi hidrolisis protein yang melepaskan peptida bioaktif dari struktur utama protein. Manfaat peptida bioaktif bergantung pada sekuens asam aminonya (Korhonen dan Pihlanto 2006) dan juga berat molekulnya (Manzoor *et al.* 2022; Peredo-Lovillo *et al.* 2022; Guo *et al.* 2023). Beberapa manfaat peptida bioaktif adalah membantu mengatasi masalah pencernaan, kardiovaskular, sistem imun dan syaraf serta untuk menjaga kesehatan secara umum (Hafeez *et al.* 2014).

SCFA merupakan asam organik yang terdiri dari satu hingga enam rantai karbon yang dinilai sebagai salah satu komponen yang memberikan manfaat kesehatan pada konsumsi produk hasil proses fermentasi. Ada tiga jenis asam lemak rantai pendek (SCFA) yang merupakan hasil metabolisme proses fermentasi yaitu asetat ( $C_2H_4O_2$ ), propionat ( $C_3H_6O_2$ ), dan butirat ( $C_4H_8O_2$ ) (Hernandez-Granados dan Franco-Robles 2020). Secara umum SCFA dihasilkan pada proses fermentasi lanjutan bakteri di dalam saluran pencernaan, dan banyak uji klinis yang sudah dilakukan untuk mengevaluasi manfaat kesehatannya. Beberapa manfaat asam lemak rantai pendek yang terindikasi di beberapa studi klinis adalah sebagai berikut pengobatan penyakit usus, pengaturan glukosa berlaku sebagai anti tumor (Aguilar-Toala *et al.* 2018; Wegh *et al.* 2019).

Proses pemanasan pangan fermentasi yang bertujuan untuk menginaktivasi mikroorganisme di dalamnya, akan memengaruhi struktur dan bioaktivitas komponen metabolit di dalamnya yang dapat memengaruhi bioaktivitasnya sebagai probiotik. Terdapat beberapa proses inaktivasi yang dapat dilakukan yaitu dengan aplikasi pemanasan, tekanan tinggi, sonikasi, iradiasi, dan sinar ultra-violet, serta metode lainnya (De Almada *et al.* 2016). Meskipun terdapat beberapa proses inaktivasi, penelitian yang dilakukan menggunakan inaktivasi dengan proses termal. Berdasarkan analisis risiko produk, maka produk yogurt dengan karakteristik  $pH < 4,6$  dan  $a_w > 0,85$  berada pada kategori produk asam dengan tingkat risiko sedang. Untuk keperluan inaktivasi mikroorganisme pada produk berasam rendah, suhu dan waktu pemanasan yang dibutuhkan tidak sama dengan untuk produk dengan karakteristik  $pH > 4,6$  dan  $a_w > 0,85$  (produk rendah asam dengan tingkat risiko tinggi) (Hariyadi 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efek proses termal terhadap komponen peptida bioaktif dan SCFA, serta mengidentifikasi potensi manfaat kesehatan dari peptida bioaktif pada produk dengan metode *in silico*. Evaluasi efek proses termal pada peptida bioaktif dan SCFA dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sebelum dan setelah proses termal. Identifikasi potensi peptida

bioaktif hasil proses termal dilakukan dengan metode *in silico* dengan menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM.

## 1.2 Rumusan Masalah

Yogurt telah diketahui memiliki manfaat kesehatan yang berasal dari metabolit yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat (BAL). Selama penyimpanan yogurt, BAL akan melakukan metabolisme yang mengakibatkan kematian BAL dan mungkin terjadi perubahan metabolit. Yogurt yang diproses secara termal memiliki umur simpan yang lebih lama dan kestabilan yang lebih baik selama penyimpanan dan distribusi pada suhu ruang. Manfaat yogurt, selain berasal dari BAL yang memiliki fungsi sebagai probiotik, metabolit yang dihasilkan seperti peptida dan asam lemak rantai pendek dapat memberikan manfaat kesehatan, sehingga muncul istilah posbiotik. Namun agar dapat dikategorikan sebagai posbiotik, perlu memenuhi beberapa kriteria, salah satunya adalah karakterisasi komponen posbiotik. Aktivitas posbiotik berasal dari sel yang telah diinaktivasi dan metabolitnya, maka untuk membuat posbiotik dilakukan pemanasan dan perlu dilakukan identifikasi dan pengujian bioaktivitas setelah pemanasan. Yogurt yang telah mengalami proses termal berpotensi sebagai produk posbiotik. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian terkait bioaktivitas metabolit yogurt. Susu merupakan sumber protein dan gula (laktosa) sehingga metabolit utama yang memiliki bioaktivitas adalah peptida yang merupakan hasil hidrolisis protein susu dan asam lemak rantai pendek (SCFA) yang disintesis pada metabolisme gula. Dengan diketahuinya bioaktivitas peptida pada yogurt dan kandungan SCFA pada yogurt, maka dapat mendukung bahwa yogurt dapat berperan sebagai produk posbiotik, walaupun masih memerlukan uji klinis untuk pembuktian manfaat kesehatannya.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah, maka penelitian ini bertujuan: (1) mengevaluasi efek proses termal terhadap komponen peptida bioaktif dan asam lemak rantai pendek (SCFA); dan (2) mengidentifikasi potensi manfaat kesehatan dari peptida bioaktif pada yogurt hasil proses termal dengan metode *in silico*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian identifikasi komponen bioaktif dari produk yogurt yang telah mengalami inaktivasi dapat dimanfaatkan oleh perusahaan untuk mendapatkan alternatif bahan pangan fungsional dengan keunggulan lebih stabil saat penyimpanan dan distribusi pada suhu ruang. Hasil dari penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk penelitian lanjutan mengenai efikasi komponen bioaktif pada produk yogurt yang telah mengalami inaktivasi.

## 1.5 Ruang Lingkup Penelitian

Penelitian ini terbatas pada produk yogurt hasil proses termal dengan menggunakan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

## 1.6 Hipotesis Penelitian

Proses termal akan menambah keragaman komponen peptida bioaktif dan bioaktivitasnya, dan memberikan pengaruh pada komposisi SCFA.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Yogurt dan Proses Pembuatannya

Yogurt pertama kali ditemukan di Turki yang kemudian berkembang ke beberapa negara lainnya sebagai bagian dari pangan tradisional di negara-negara tersebut. Pada awal abad ke-20, ilmuwan Bulgaria bernama Stamen Grigorov mengidentifikasi bakteri yang hidup pada yogurt di negaranya sebagai *Lactobacillus*, dan penemuan tersebut menjadi asal mula penamaan *Lactobacillus bulgaricus*. Penemuan dari Grigorov kemudian dilanjutkan dengan penelitian lebih lanjut oleh ilmuwan Rusia bernama Ilya Ilich Metchinkoff yang kemudian mengidentifikasi bahwa bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* adalah bakteri yang memberi manfaat kesehatan dan panjang umur pada orang-orang Bulgaria. Hasil penemuan Metchinkoff ini kemudian yang menginspirasi Isaac Carasso untuk melakukan komersialisasi produk yogurt pertama kali di dunia pada tahun 1919 di Barcelona (Germani *et al.* 2014; Fisberg dan Machado 2015).

Berdasarkan definisi kategori pangan dari Badan Pengolahan Obat dan Makanan (BPOM), “yogurt berperisa/rasa adalah produk susu yang diperoleh dari fermentasi susu dengan menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, dapat ditambahkan bakteri lain yang sesuai, dengan penambahan perisa/rasa” (BPOM 2023). Di Indonesia terdapat produk fermentasi susu tradisional di daerah Sumatra Barat yang disebut sebagai dadih, berasal dari susu kerbau yang difermentasi pada potongan bambu. Berdasarkan Euromonitor (2021), terjadi peningkatan penjualan yogurt di Indonesia pada tahun 2018 hingga tahun 2021 sebesar 50%, dan diperkirakan mengalami peningkatan penjualan hingga 100% pada tahun 2026.

Perkembangan yogurt di Indonesia terbilang lambat jika dibandingkan dengan negara-negara di Eropa ataupun negara maju di Asia. Salah satu faktornya adalah kendala proses distribusi yogurt yang membutuhkan distribusi rantai dingin (*cold chain distribution*) untuk menjaga manfaat kesehatan dari BAL. Secara umum jenis yogurt yang dipasarkan dapat diklasifikasikan menjadi: (1) yogurt *set*: yogurt yang diinkubasi dalam kemasan kemudian didinginkan; (2) yogurt *stirred*: yogurt yang diinkubasi dalam tanki fermentasi kemudian didinginkan sebelum dikemas; (3) minuman yogurt: yogurt yang diproses sama dengan yogurt *stirred*, namun koagulannya diubah menjadi cairan terlebih dahulu sebelum dikemas; (4) yogurt *frozen*: yogurt yang diinkubasi dalam tanki kemudian dibekukan seperti es krim; dan (5) yogurt *concentrate*: yogurt yang diinkubasi dalam tanki kemudian dikonsentrasikan sebelum dikemas, contohnya *Greek* yogurt.

Proses fermentasi merupakan proses yang menghasilkan perubahan kimia pada senyawa organik melalui aktivitas enzim. Secara biokimia didefinisikan sebagai ekstraksi energi dari karbohidrat pada kondisi anaerob. Sedangkan pada industri pangan, proses fermentasi merujuk pada proses produksi yang melibatkan aktivitas mikroorganisme untuk menghasilkan perubahan yang diharapkan pada makanan atau minuman. Ilmu mengenai fermentasi dikenal sebagai zimologi.

Penggunaan fermentasi untuk pembuatan minuman sudah dikenal sejak zaman neolitik, dimana hal ini terdokumentasi di Tiongkok, India, Mesir, Meksiko, dan beberapa negara lain untuk pembuatan minuman anggur beralkohol. Beberapa



ilmuwan meneliti perubahan kimia yang terjadi pada minuman anggur beralkohol, namun banyak pendapat bertentangan mengenai penyebab perubahan pada produk. Titik balik penelitian terjadi ketika Louis Pasteur menemukan bahwa fermentasi asam laktat disebabkan oleh mikroorganisme hidup. Pasteur mendemostrasikan bahwa bakteri dapat menyebabkan susu menjadi asam, sehingga teridentifikasi penyebab kerusakan pangan disebabkan oleh mikroorganisme yang kemudian mengarah pada penemuan proses pasteurisasi. Pada tahun 1870, Pasteur membuat jurnal mengenai fermentasi yang mendefinisikan fermentasi sebagai “Kehidupan tanpa udara”, dimana jenis mikroorganisme tertentu akan menghasilkan tipe fermentasi dan produk akhir yang spesifik.

Yogurt dibuat dengan proses fermentasi dengan menggunakan dua BAL yaitu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Kedua BAL ini tergolong sebagai fakultatif anaerob dimana dapat terinaktivasi pada suhu 70 °C. BAL menggunakan laktosa sebagai sumber karbon, dimana laktosa difermentasi menghasilkan asam laktat, dan tergolong bakteri homofermentatif yang memproduksi asam laktat (lebih dari 90%) sebagai hasil utama fermentasi (Germani *et al.* 2014). Aktivitas bakteri mengarah pada konversi laktosa menjadi asam laktat (sekitar 0,8 – 1,4% dari produk akhir), dan menurunkan pH menjadi 4,2 – 4,6. pH yang rendah dapat mengganggu kesetimbangan kompleks kalsium kaseinat fosfat, sehingga menyebabkan koagulasi yang memberikan tekstur pada produk akhir.

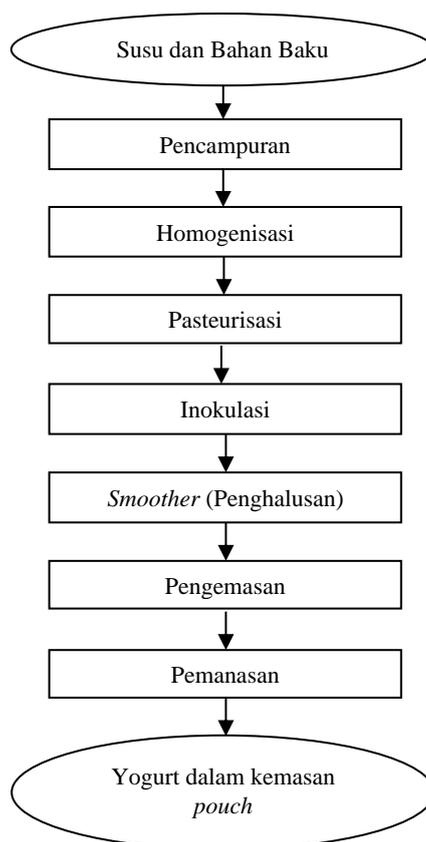
Selama proses fermentasi, sebagian protein terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino bebas (Germani *et al.* 2014). Produksi yogurt adalah contoh proses simbiosis bakteri dimana pertumbuhan satu bakteri mendukung pertumbuhan bakteri yang lainnya. Pada tahap awal ketika pH masih tinggi, *Streptococcus* akan tumbuh lebih cepat dan menurunkan pH sampai ke sekitar pH 5. Aktivitas *Streptococcus* selama proses fermentasi menghasilkan asam laktat, asam format dan CO<sub>2</sub>. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* berperan dalam menstimulasi pertumbuhan *Lactobacillus*, yang didukung oleh kondisi lingkungan anaerob. Proses hidrolisis protein, pembentukan asam amino bebas dan oligopeptida, merupakan hasil aktivitas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Pada pH di bawah 5,  $\beta$ -casein menjadi lebih rentan terhadap aktivitas proteolitik yang disebabkan oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, karena struktur  $\beta$ -casein menjadi tidak stabil setelah melalui proses pasteurisasi.

Pembentukan asam amino bebas pada produksi yogurt memiliki dua fungsi yaitu untuk menstimulasi aktivitas *Streptococcus* dan untuk menghasilkan aroma yogurt yang spesifik. Aktivitas pertumbuhan *Streptococcus* distimulasi oleh asam amino tertentu yang dihasilkan oleh *Lactobacillus*, dan biasanya menggunakan sekitar 50 – 60% asam amino untuk mendukung aktivitas pertumbuhannya (Germani *et al.* 2014). Sebagian besar asam amino diproduksi diawal proses fermentasi dan kemudian akan berkurang karena digunakan untuk aktivitas bakteri tersebut. Komponen aromatik yogurt didapatkan dari *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Dimana *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* menghasilkan asetaldehid (paling dominan pada aroma yogurt) dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* menghasilkan diketon.

Beberapa hal yang perlu diperhatikan saat proses produksi yogurt yaitu kondisi lingkungan untuk pertumbuhan BAL seperti suhu, waktu, dan proses

setelah fermentasi. Proses termal (pasteurisasi) diterapkan pada awal proses (sebelum fermentasi) untuk memastikan tidak ada pertumbuhan mikroorganisme lain yang menghambat pertumbuhan BAL. Kemudian susu (media) dikondisikan pada suhu tertentu sesuai dengan suhu optimum pertumbuhan BAL. Setelah mencapai pH tertentu dimana ditandai dengan pembentukan aroma dan tekstur yang diharapkan maka proses fermentasi dihentikan dengan melakukan pendinginan. Kemudian setelah proses fermentasi selesai terdapat beberapa proses yang dilakukan untuk menghasilkan produk yogurt sesuai dengan target yang akan dipasarkan.

Penelitian ini akan difokuskan pada pembuatan yogurt *stirred* yang dikemas dalam kemasan *pouch*, secara garis besar proses pembuatannya dapat dijelaskan pada Gambar 1. Proses termal yang diaplikasikan setelah fermentasi menentukan umur simpan dari produk dan menginaktivasi BAL dalam yogurt. Proses inaktivasi mengakibatkan BAL yang terdapat pada produk menjadi tidak aktif sehingga efikasi kesehatan produk yogurt perlu diidentifikasi lebih lanjut. BAL yang tidak aktif mengakibatkan produk yogurt yang dihasilkan tidak sensitif terhadap suhu penyimpanan sehingga proses distribusi dapat dilakukan secara luas serta biayanya juga lebih rendah.



Gambar 1 Tahapan pembuatan produk yogurt dalam kemasan

## 2.2 Posbiotik dan Komponennya

Mikrobiota adalah kumpulan mikroorganisme yang tumbuh berkembang dalam tubuh manusia termasuk dengan hasil metabolismenya. Tubuh manusia merupakan inang yang baik, karena memberikan nutrisi untuk mikroorganisme

berkembang biak. Mikroorganisme ini kemudian memberikan manfaat kepada inangnya (Wegh *et al.* 2019; Zolkiewicz *et al.* 2020). Beberapa manfaat dari mikrobiota adalah stimulasi sistem imun, meningkatkan penyerapan dan pencernaan makanan, minimalisasi pertumbuhan bakteri patogen dan menjaga kesehatan usus. Manfaat ini terjadi karena interaksi mikrobiota dalam sistem pencernaan yang memberikan efek ke organ tubuh lainnya. Terminologi mikrobiota secara umum dikenal dengan istilah prebiotik dan probiotik yang memiliki hubungan sinbiotik dalam menjaga kesehatan inangnya dalam hal ini tubuh manusia (Zolkiewicz *et al.* 2020).

Pada akhir masa simpan produk mengandung BAL terdapat sejumlah mikroorganisme yang mati. Potensi dari sel mikroorganisme yang mati dan juga metabolit yang dihasilkan menjadi poin penelitian yang menarik. Produk hasil fermentasi yang mengalami proses termal lanjutan seperti pasteurisasi ataupun pemanggangan, juga akan meninggalkan sejumlah mikroorganisme mati dan metabolit yang dihasilkan. Hasil fermentasi dari BAL dapat menghasilkan beberapa metabolit yang dapat memberikan manfaat untuk kesehatan seperti fragmen dinding sel, asam lemak rantai pendek (SCFA), asam amino, enzim, peptida bioaktif, eksopolisakarida (EPS), dan vitamin (Germani *et al.* 2014; Zolkiewicz *et al.* 2020; Peredo-Lovillo *et al.* 2022).

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang dapat memberikan manfaat kesehatan kepada inangnya (FAO 2002). Beberapa bukti ilmiah menunjukkan bahwa mikroorganisme yang telah mengalami proses inaktivasi juga memiliki potensi untuk memberikan manfaat kesehatan. Berdasarkan hal tersebut, Taverniti dan Guglielmetti (2011) mengusulkan istilah paraprobiotik untuk merujuk pada sel mikroba atau fragmen sel yang telah diinaktivasi namun tetap memberikan manfaat kesehatan. Selain itu, berkembang pula istilah posbiotik, yang didefinisikan sebagai aktivitas metabolit probiotik atau molekul yang dilepaskan yang mampu memberikan efek menguntungkan bagi inang, baik secara langsung maupun tidak langsung (Tsilingiri *et al.* 2011). *The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics* (ISAPP) pada tahun 2021 mendefinisikan posbiotik sebagai mikroorganisme mati dan/atau metabolitnya yang dihasilkan melalui proses tertentu, yang dapat memberikan manfaat kesehatan pada inangnya. Definisi ini mengintergrasikan konsep paraprobiotik dan posbiotik yang sebelumnya memiliki definisi yang berbeda.

Saat ini berkembang beberapa metode yang digunakan untuk inaktivasi mikroorganisme, contoh aplikasi proses yang digunakan untuk inaktivasi adalah proses pemanasan (termal), radiasi, sinar UV, penambahan bahan kimia, penambahan asam, penggunaan tekanan tinggi, dan beberapa metode inaktivasi lainnya. Komposisi posbiotik dapat dipengaruhi oleh proses inaktivasinya dan jenis mikroorganisme yang digunakan dalam proses fermentasi. Sebagai contoh protein yang dihasilkan dari fermentasi bakteri mengalami denaturasi dengan inaktivasi proses termal, sedangkan aplikasi proses inaktivasi radiasi mengakibatkan mutasi asam nukleat. Komposisi posbiotik dan efikasinya pada manusia bergantung pada proses produksi secara keseluruhan (Wegh *et al.* 2019).

Posbiotik memiliki keunggulan lain selain dari manfaat kesehatan yaitu kestabilan terhadap suhu dan keberadaan oksigen (Salminen *et al.* 2021). Posbiotik berpotensi diaplikasikan pada negara berkembang yang mengalami kesulitan dalam mengontrol produksi dan distribusi produk hasil fermentasi (Wegh *et al.* 2019).

Sejalan dengan kondisi geografis Indonesia, posbiotik berpotensi untuk memperluas area distribusi dan menekan biaya distribusi karena manfaat kestabilan suhu. Selain itu, posbiotik juga berpotensi untuk menanggulangi masalah keamanan yang timbul karena penggunaan sel mikroorganisme hidup (intoksifikasi). Posbiotik merupakan pilihan pangan fungsional yang lebih stabil selama penyimpanan.

Posbiotik dapat memberikan manfaat kesehatan pada inangnya dengan modulasi sistem imun tubuh dengan penggunaan fragmen dinding sel dari mikroorganisme yang sudah mati, dimana bagian dinding sel yang sudah tidak aktif ini akan menempel ke sel saluran pencernaan untuk menghambat patogen. Selain itu posbiotik juga dapat memberikan manfaat kesehatan melalui sekresi metabolit (De Almada *et al.* 2016). Berikut adalah komponen bioaktif hasil inaktivasi yang diindikasikan memberikan manfaat kesehatan pada tubuh manusia (Tavernitti dan Guglielmetti 2011; De Almada *et al.* 2016; Germani *et al.* 2014; Zolkiewicz *et al.* 2020):

a Sel mikroba

Inaktivasi sel bakteri dapat dicapai melalui metode fisik (disrupsi mekanis, perlakuan panas, iradiasi gamma atau UV, tekanan hidrostatik tinggi, pengeringan beku, sonikasi) atau metode kimia (inaktivasi dengan asam). Metode-metode ini dapat mengubah struktur sel mikroba atau fungsi fisiologisnya; akibatnya, bakteri menjadi tidak mampu tumbuh tetapi tetap mempertahankan efek kesehatan yang menguntungkan sebagaimana bentuknya yang masih hidup. Sel mikroba yang tidak aktif memiliki keunggulan keamanan dibandingkan dengan probiotik. Hal ini disebabkan oleh penurunan risiko translokasi mikroba, infeksi, atau respons inflamasi yang meningkat, yang dilaporkan pada beberapa probiotik di kalangan konsumen dengan sistem imun yang tidak seimbang atau terganggu.

b Fragmen dinding sel

Komponen dari dinding sel bakteri bersifat imunogenik (menimbulkan respon imun yang spesifik), salah satunya adalah asam lipoteikoat yang ditemukan pada dinding sel bakteri gram positif, asam lipoteikoat ini dapat dilepaskan secara spontan ke lingkungan sekitarnya. Beberapa data efikasi asam lipoteikoat untuk manfaat kesehatan masih ambigu karena selain beberapa data menunjukkan hasil positif, beberapa data juga menunjukkan bahwa asam lipoteikoat menginduksi terjadinya peradangan. Salah satu contoh penggunaan yang efektif adalah pada aplikasi topikal untuk masalah kulit, dimana asam lipoteikoat yang dihasilkan oleh *Lactobacillus* dan *Bifidobacteria* menstimulasi sel kulit untuk memberikan respon imun pada infeksi dari bakteri maupun virus.

c Asam lemak rantai pendek (SCFA)

SCFA merupakan hasil fermentasi polisakarida oleh mikroorganisme pada saluran pencernaan. Beberapa jenis SCFA yang banyak dikenal adalah asetat, propionat, dan butirrat. Butirrat adalah sumber energi penting untuk enterosit karena membantu regenerasi epitelium saluran pencernaan. Butirrat memiliki kegunaan untuk mengurangi peradangan dan juga menekan reaksi alergi. Asetat dapat meningkatkan sensitivitas insulin dan mengurangi lemak tubuh dengan meningkatkan level GLP-1. Selain itu asetat dapat mengatur nafsu makan pada sistem saraf utama sehingga berpotensi untuk mencegah penyakit kardiovaskular. Asetat juga meningkatkan ketahanan tubuh terhadap infeksi yang disebabkan oleh bakteri Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7. Propionat juga memiliki



efek untuk mengurangi peradangan dan menghambat penyerapan kolesterol dalam tubuh.

#### d Asam amino

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Germani *et al.* (2014) terdapat perubahan profil asam amino saat proses pasteurisasi susu segar yang mengakibatkan denaturasi protein. Selama proses fermentasi, asam amino bebas dimanfaatkan oleh dua jenis bakteri yang berperan dalam fermentasi, terutama *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Metabolisme asam amino rantai cabang ini saling berkaitan dan berkontribusi pada pembentukan komponen aromatik, seperti diketon. Asam glutamat digunakan oleh *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* untuk mensintesis arginin. Fenomena ini terlihat dari penurunan jumlah asam glutamat pada yogurt sebelum pengemasan dibandingkan dengan susu pasteurisasi. Penurunan jumlah treonin disebabkan karena asam amino ini digunakan oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* untuk membentuk asetaldehid, yang berkontribusi pada pembentukan aroma khas yogurt.

Observasi pada produk yogurt plain menunjukkan bahwa jumlah total asam amino pada akhir masa simpan lebih tinggi dibandingkan dengan awal masa simpan. Hal ini mengindikasikan bahwa aktivitas pembentukan asam amino lebih besar daripada penggunaannya selama penyimpanan. Akumulasi asam amino pada akhir masa simpan meningkat hingga 150% dibandingkan dengan jumlah pada awal masa simpan. Penambahan gula dan sari buah diketahui dapat menurunkan aktivitas bakteri, sehingga jumlah asam amino yang dihasilkan pada yogurt dengan tambahan ini lebih sedikit dibandingkan dengan yogurt plain.

#### e Peptida

Peptida merupakan salah satu hasil metabolit proses fermentasi yang dihasilkan dengan cara menghidrolisis protein menjadi sekuens asam amino (Gurunathan *et al.* 2023). Fermentasi adalah salah satu cara untuk melepaskan peptida dari struktur protein utama, terdapat beberapa metode lain untuk mendapatkan peptida yang memiliki aktivitas biologis (Clare dan Swaisgood 2000). Peptida yang memiliki potensi manfaat kesehatan disebut sebagai peptida bioaktif. Bioaktivitas peptida bergantung pada sekuens asam amino, komposisi, panjang sekuens dan muatannya. Bioaktivitas peptida dapat berupa antioksidan, anti mikroba, *immunomodulatory*, anti kanker, anti hipertensi, anti inflamasi, *anti-lipidemic*, dan fungsi yang berhubungan dengan sistem endokrin pada tubuh manusia (Manzoor *et al.* 2022).

#### f Enzim

Mikroorganisme memiliki mekanisme pertahanan terhadap efek bahaya dari *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat merusak lemak, protein, karbohidrat dan asam nukleat. Enzim antioksidan seperti *glutathione peroxidase* (GPx), *peroxide dismutase* (SOD), katalase, dan NADH-oxidase memiliki peranan penting dalam menghadapi ROS. Sebagai contoh *Lactobacillus fermentum* dan *Lactobacillus plantarum* memiliki kandungan GPx yang tinggi sehingga memiliki efek antioksidan. Beberapa *Lactobacillus* hasil modifikasi genetika memiliki kandungan SOD dan katalase yang memberikan efek antioksidan dan anti peradangan yang berfungsi untuk membantu kesehatan pencernaan.

g Eksopolisakarida (EPS)

Selama periode pertumbuhannya, mikroorganisme menghasilkan biopolimer dengan sifat kimia yang berbeda, yang kemudian dilepaskan pada bagian luar dinding selnya membentuk kelompok senyawa heterogen disebut sebagai eksopolisakarida (EPS). EPS banyak digunakan pada industri farmasi dan pangan fungsional, seperti contohnya EPS yang didapatkan dari *Lactobacillus casei* digunakan untuk meningkatnya efektivitas vaksin penyakit kaki dan mulut. EPS dari *Lactobacillus helveticus* digunakan sebagai antimikroba dan antioksidan, EPS dari *Lactobacillus kefiranofaciens* digunakan untuk menghambat penyerapan kolesterol sehingga berfungsi untuk mencegah penyakit kardiovaskular.

h Vitamin

Beberapa jenis vitamin yang dihasilkan dari metabolisme bakteri adalah asam folat, vitamin B12 dan vitamin K. Beberapa studi klinis menunjukkan korelasi antara konsumsi pangan hasil fermentasi dengan meningkatnya *bioavailability* dari vitamin pada hasil pengecekan serum darah.

### 2.2.1 Peptida Bioaktif

Peptida bioaktif adalah senyawa organik yang terbentuk dari beberapa asam amino dengan ikatan kovalen (ikatan peptida). Beberapa peptida bioaktif ditemukan pada sumber daya alami, namun sebagian besar terdapat pada struktur protein yang diproses lebih lanjut dengan proses enzimatik, proses fermentasi, dan sintesis kimia. Peptida bioaktif memiliki peranan penting pada kesehatan manusia, seperti kesehatan pencernaan, endokrin, kardiovaskular, sistem imun dan syaraf. Komposisi dan sekuens asam amino menentukan aktivitas peptida bioaktif. Sebagian besar peptida bioaktif yang memiliki fungsi struktural terdiri dari 2 - 20 asam amino dan asam amino hidrofobik seperti prolin, lisin dan arginin (Sanchez dan Vazquez 2017; Manzoor *et al.* 2022; Guo *et al.* 2023).

Pada proses fermentasi terjadi proteolisis pada protein susu yang disebabkan oleh enzim proteinase dan peptidase. Selama proses fermentasi, sebagian protein terhidrolisis menjadi peptida dan asam amino bebas (Germani *et al.* 2014). Nilai gizi dari protein ditentukan oleh kandungan asam amino. Asam amino adalah komponen utama penyusun protein, protein terdiri rangkaian asam amino dengan urutan tertentu, dimana rangkaian ini disebut sebagai sekuens asam amino.

Selama proses produksi (fermentasi, pemanasan dan tekanan tinggi), komponen pangan mengalami perubahan tekstur, rasa, kestabilan dan peptida bioaktif yang dihasilkan (Peredo-Lovillo *et al.* 2022). Proses hidrolisis enzimatik dan fermentasi adalah dua metode yang biasa digunakan untuk mensintesa peptida bioaktif. Proses fermentasi lebih kompleks dibandingkan dengan proses hidrolisis enzimatik, karena pada proses fermentasi melibatkan faktor waktu fermentasi, sumber protein dan jenis bakteri yang digunakan. Sedangkan pada proses hidrolisis enzimatik, variabel jenis enzim dan proses enzimatisnya sudah spesifik.

Peptida dengan aktivitas biologis tinggi dihasilkan dari reaksi mikrobiologi protease yang beragam. Tipe mikroorganisme yang digunakan dalam proses hidrolisis merupakan faktor penting untuk optimalisasi pembentukan peptida bioaktif dengan aktivitas tinggi (Daliri *et al.* 2017). Sebuah studi perbandingan hasil fermentasi bakteri *Bacillus amyloliquidfaciens* U304 dengan *Lactobacillus acidophilus* menunjukkan bahwa *Bacillus*

*amyloliquidfaciens* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi karena aktivitas protease yang lebih tinggi, hal ini diindikasikan dari berat molekul peptida yang lebih rendah (Peredo-Lovillo *et al.* 2022). Peptida bioaktif dengan berat molekul yang rendah memiliki bioaktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan peptida bioaktif dengan berat molekul tinggi (Manzoor *et al.* 2022; Peredo-Lovillo *et al.* 2022; Guo *et al.* 2023). Peptida bioaktif dengan berat molekul yang rendah memiliki rantai pendek dan lebih reaktif dalam mengikat radikal bebas dalam fungsinya sebagai antioksidan (Manzoor *et al.* 2022).

Proses fermentasi protein susu dengan menggunakan BAL dapat menghasilkan peptida bioaktif yang berpotensi sebagai pangan fungsional. Peptida bioaktif dengan sekuens asam amino Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro menunjukkan manfaat menurunkan tekanan darah pada tikus yang hipertensi sedangkan sekuens asam amino Tyr-Pro dan Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln menunjukkan fungsi sebagai ACE inhibitor pada tikus yang hipertensi. Komposisi peptida bioaktif bergantung dari sumber protein dan proses hidrolisisnya. Berikut adalah contoh sekuensing peptida dan bioaktivitasnya.

Tabel 1 Bioaktivitas dan peptida bioaktif

Bioaktivitas	Sekuens peptida
Antimikroba	FSDKKIAK EQLTK
Antihipertensi, ACE	LKP AKYSY KRQKYD SVPQPK VVYPWYQ
Antihipertensi	KVREGTTY VPIIP
Antioksidan, <i>radical scavenging</i> Antioksidan	WYSLAMAASDI VECYGPNRPQF LVNPHDQNLK
<i>Hipoglucemiant</i>	IBYW KLPGF
<i>Immunomodulatory</i>	GGGGYPMYPLR GLF
Antikanker <i>Opioid</i>	GLLDLL YGLF
Antiradang <i>Platelet activating inhibition</i>	LDAVNR NIGK

Sumber: Sanchez dan Vazques 2017

### 2.2.2 Asam Lemak Rantai Pendek (SCFA)

SCFA merupakan salah satu hasil metabolit mikroorganisme selama proses fermentasi, dimana jenis SCFA yang paling banyak ditemukan adalah asetat (C<sub>2</sub>), propionat (C<sub>3</sub>) dan butirrat (C<sub>4</sub>). Perbedaan jenis mikroorganisme saat fermentasi menghasilkan rasio SCFA yang berbeda (Hernandez-Granados dan Franco-Robles 2020). Penambahan prebiotik (serat pangan) dapat meningkatkan produksi SCFA pada sistem pencernaan. Kriteria bahan disebut sebagai

prebiotik adalah tidak dapat dicerna (sebagian) sehingga sebagai konsekuensinya bahan ini masuk ke dalam usus untuk difermentasi oleh bakteri spesifik. Proses fermentasi prebiotik meningkatkan produksi dan rasio SCFA, meningkatkan massa feses, mengurangi pH usus dan meningkatkan sistem imun. Prebiotik harus memiliki ketahanan terhadap proses produksi, dalam artinya tidak mengalami perubahan kimia sehingga dapat digunakan untuk metabolisme bakteri (Markowiak dan Slizewska 2017).

SCFA secara umum berfungsi untuk menjaga fungsi sistem pencernaan, berkontribusi dalam metabolisme karbohidrat dan lemak, merubah jaringan adiposa dan sistem imun. Peran SCFA dalam dalam metabolisme karbohidrat dan lemak, membuat SCFA berkontribusi dalam mengurangi risiko penyakit karena peradangan, obesitas, diabetes dan beberapa masalah kesehatan yang disebabkan kegagalan metabolisme. Pada sebuah penelitian menggunakan tikus percobaan terbukti bahwa suplementasi butirir disertai dengan pola makan tinggi lemak terbukti mencegah pembentukan insulin resistance (IR) dan obesitas. Peningkatan konsentrasi butirir dapat menurunkan kolesterol, total asam lemak termasuk trigliserida, sebagai konsekuensinya maka sensitivitas terhadap insulin meningkat. Mekanisme anti obesitas pada butirir disebabkan karena adanya peningkatan konsumsi energi dan oksidasi asam lemak (Bourebaba *et al.* 2022).

Asetat banyak ditemukan pada sirkulasi perifer, propionat dihasilkan dari proses metabolisme glukogenesis pada hati, sedangkan butirir digunakan sebagai sumber energi untuk kolonisasi. Butirir juga memiliki fungsi lain seperti meningkatkan fungsi perlindungan dan imunitas sistem pencernaan, anti tumor, anti inflamasi, mengontrol obesitas, mengontrol homeostatis glukosa, dan mengontrol penyakit kardiovaskular (Wegh *et al.* 2019; Park *et al.* 2022; Fusco *et al.* 2023). Manfaat kesehatan yang didapatkan dari posbiotik dalam bentuk SCFA bergantung pada proses produksinya (Hernandez-Granados dan Franco-Robles 2020). Produksi asetat mendukung pertumbuhan bakteri yang menghasilkan propionat dan butirir. Sebaliknya butirir yang dihasilkan juga mendukung pertumbuhan bakteri yang menghasilkan asetat. Kondisi ini menunjukkan hubungan yang saling menguntungkan pada bakteri penghasil SCFA (Fusco *et al.* 2023).

### 2.3 Proses Inaktivasi

Posbiotik dapat dihasilkan dari inaktivasi mikroorganisme dengan beberapa metode seperti proses termal (pemanasan), tekanan tinggi, sinar UV, iradiasi, maupun metode lainnya yang dapat mengakibatkan mikroorganisme menjadi tidak aktif. Perlakuan panas, tekanan tinggi, sonifikasi, *microwave* pada proses produksi pangan dapat mengakibatkan perubahan reaksi proteolitik pada protein sehingga meningkatkan aktivitas peptida (FitzGerald *et al.* 2020; Peredo-Lovillo *et al.* 2022). Penelitian yang dilakukan oleh Khan *et al.* (2017) menunjukkan bahwa proses pemanasan dapat meningkatkan jumlah SCFA (butirir) pada susu sapi dan susu kerbau.

Proses pemanasan adalah metode paling umum yang digunakan untuk inaktivasi bakteri, meliputi aplikasi panas pada waktu tertentu. Beberapa metode pemanasan yang umum digunakan adalah pasteurisasi dan sterilisasi. Pasteurisasi menggunakan panas dengan temperatur relatif rendah, umumnya di bawah 100 °C.



Sterilisasi adalah proses yang menggunakan panas dengan suhu lebih tinggi ( $> 100$  °C). Desain proses didasarkan pada ketahanan panas mikroorganisme yang direpresentasikan dengan nilai D dan Z. Nilai D adalah waktu yang dibutuhkan (dalam menit) pada suhu tertentu untuk mengurangi 90% (1 siklus logaritmik) dari populasi mikroorganisme. Sedangkan nilai Z menunjukkan perubahan suhu yang diperlukan untuk merubah nilai D sebesar 90%. Proses pemanasan dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti tipe mikroorganisme, suhu, media pertumbuhannya, fase pertumbuhannya, *water activity*, pH, dan beberapa faktor lainnya.

Proses inaktivasi dengan panas secara umum dapat merusak membran sel, mengurangi nilai gizi, merusak DNA, menyebabkan agregasi ribosom, menginaktivasi enzim, dan mengakibatkan koagulasi protein. Pada kasus probiotik, aplikasi panas diketahui dapat meningkatkan kerusakan pada permukaan sel, yang menjadi lebih kasar dan keras. Semakin tinggi suhu yang diaplikasikan, tingkat kekasaran dan kekerasan permukaan sel meningkat dibandingkan dengan permukaan sel yang tidak dipanaskan (De Almada *et al.* 2016). Peningkatan kekasaran dan kekerasan permukaan sel tersebut dapat mengurangi manfaat kesehatan karena menurunkan sifat adhesi terhadap inang. Sifat adhesi merupakan parameter penting bagi probiotik, terutama dalam pengaturan sistem imun dan mekanisme eliminasi patogen (Deshpande *et al.* 2018).

Berdasarkan tingkat potensi bahaya pangan dilihat dari nilai pH dan  $a_w$ , maka produk yogurt dengan karakteristik  $pH < 4,6$  dan  $a_w > 0,85$  berada pada kategori produk produk asam (diasamkan) dengan tingkat risiko sedang (Hariyadi 2014). Suhu dan waktu pemanasan yang diperlukan untuk inaktivasi mikroorganisme dengan kategori produk asam tidak perlu ekstrim jika dibandingkan produk dengan karakteristik  $pH > 4,6$  dan  $a_w > 0,85$  (produk rendah asam dengan tingkat risiko tinggi). Hariyadi (2014) menyatakan bahwa perlakuan pasteurisasi dengan kombinasi perlakuan lain (misalnya pengendalian pH) dapat menghasilkan produk yang *shelf stable*.

## 2.4 Metode *In Silico* untuk Identifikasi Bioaktivitas Peptida

*In silico* berasal dari bahasa latin yaitu *in silicio* yang artinya adalah silikon pada prosesor komputer. Metode ini ditemukan pada tahun 1987 oleh Christopher Langton pada saat mendeskripsikan kehidupan buatan pada penelitian yang dilakukannya. Pada tahun 1989, mulai dilakukan ekspresi metode ini kedalam sistem komputer oleh Pedro Miramontes, seorang ilmuwan matematika dari Meksiko. Aplikasi simulasi komputer dengan menggunakan metode *in silico* di bidang biologi, biokimia dan kimia sedang menjadi tren. Beberapa data sekuens protein berbasis internet telah banyak tersedia dan digunakan untuk analisis di bidang biologi, kedokteran, bioteknologi dan ilmu pangan. Metode *in silico* dapat digunakan sebagai indikasi potensi bioaktivitas ataupun karakteristik sensori dari peptida, potensi alergen dari peptida sehingga hasil dari analisis metode ini dapat digunakan untuk menentukan arah riset berikutnya (Minkiewicz *et al.* 2008).

Prediksi metode *in silico* adalah berdasarkan prinsip *quantitative structure-activity relationship* (QSAR), yaitu pemodelan aktivitas atau fungsi dari spesifik target dideskripsikan berdasarkan deskripsi molekular atau fisiko kimianya (Barati *et al.* 2023). Salah satu pangkalan data peptida bioaktif yang sering digunakan adalah BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>), pangkalan data ini berisi informasi tentang protein, peptida bioaktif, alergen, peptida sensori

dan asam amino (Minkiewicz *et al.* 2022). Jumlah pangkalan data peptida bioaktif pada BIOPEP-UWM adalah 4911 (diakses: 18 Mei 2024). Beberapa aktivitas biologis yang terdapat dalam aplikasi BIOPEP-UWM adalah antimikroba, anti trombosis, antihipertensi, opioid, *immunmodulator*, *ACE inhibitor*, antioksidan, dan potensi bioaktivitas lainnya.

Identifikasi peptida bioaktif dengan menggunakan metode *in vitro* dan *in vivo* membutuhkan biaya besar dan waktu yang lama, sehingga simulasi dengan metode *in silico* dapat menghemat biaya, karena dapat memberikan hipotesis yang lebih terarah untuk penelitian lanjutan (Sitanggang *et al.* 2018; Amin *et al.* 2022). Integrasi antara *in silico* dengan *in vitro* atau *in vivo* merupakan cara yang paling efektif dan efisien untuk pembuktian efikasi peptida bioaktif dengan biaya dan waktu yang terkontrol (Barati *et al.* 2023).

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### III METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada September 2023 hingga Mei 2024. Tahap awal penelitian dilakukan pembuatan produk di *Pilot Plant* PT XYZ di daerah Sukabumi. Analisis produk dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu: (1) analisis proksimat di laboratorium PT XYZ Jakarta; (2) analisis komposisi SCFA di laboration Saraswanti Indo Genetech (SIG) Bogor; (3) filtrasi supernatan di laboratorium mikrobiologi South-East Asia Food and Agricultural Science and Technology Center (SEAFast Center) Bogor; dan (4) analisis sekuens peptida di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gajah Mada (UGM) Yogyakarta.

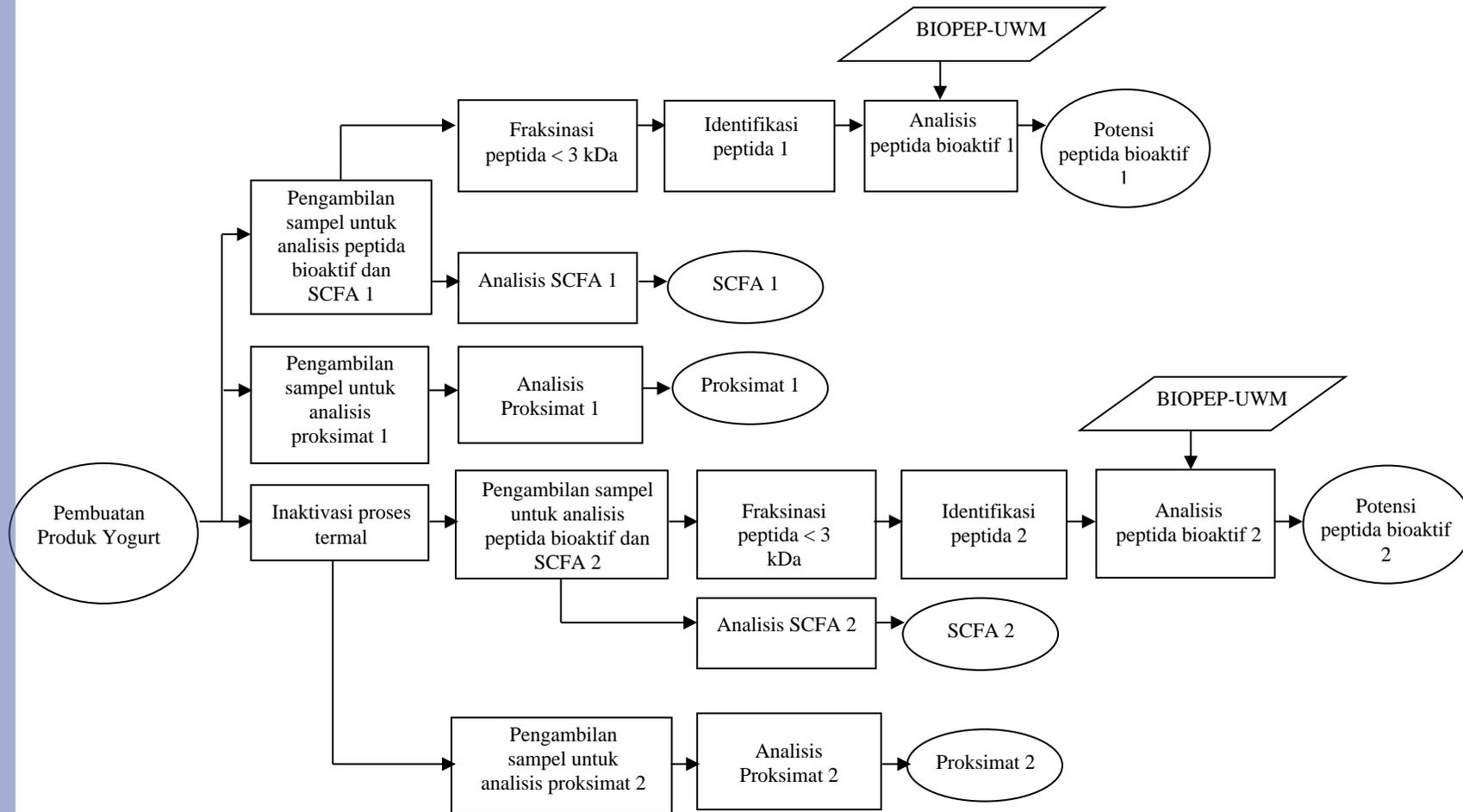
#### 3.2 Alat dan Bahan

Bahan utama yang digunakan untuk membuat produk yogurt adalah susu bubuk lemak penuh (10%), susu bubuk skim (1%), gula, penstabil nabati, perisa, dan kultur yogurt. Kultur yogurt yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur kering beku yang mengandung campuran *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Kultur starter ini diperoleh dari International Flavors and Fragrances (IFF) dengan kode YO-MIX 883 LYO 250 DCU.

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitis (*Mettler Toledo AL204*), peralatan gelas, pipet, saringan, *mixer* (*Silverson LART*), *homogenizer*, kompor listrik, oven, *centrifuge*, tabung *falcon*, *filter tube* 10 kDa, *filter tube* 3 kDa, tabung reaksi, *waterbath*, *Tube Heat Exchanger*, UPLC, GC-FID, LC-HRMS, aplikasi XLSTAT, serta aplikasi BIOPEP-UWM.

#### 3.3 Prosedur Penelitian

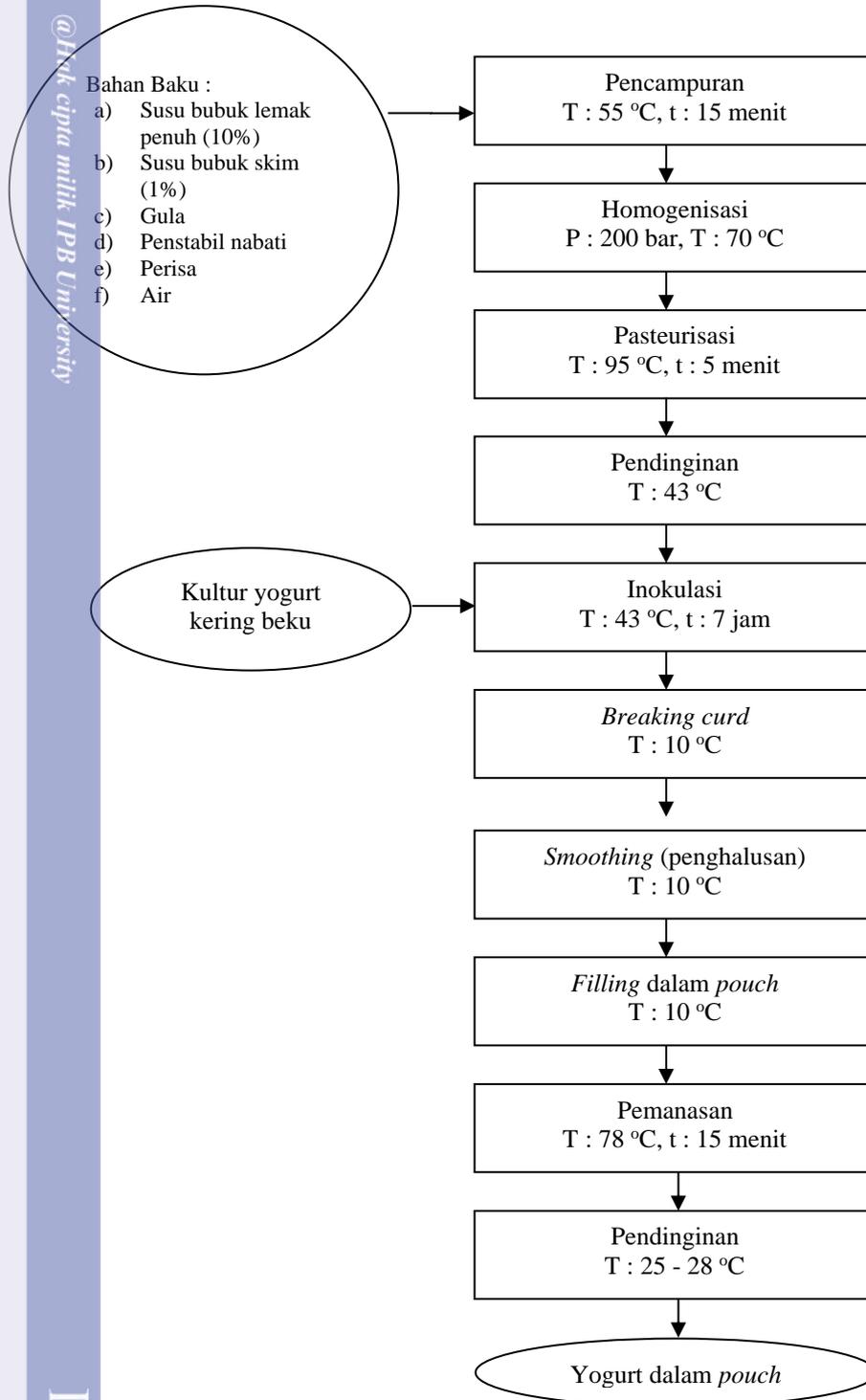
Tahapan penelitian yaitu mengidentifikasi komponen bioaktif SCFA dan peptida bioaktif dari mulai tahap awal pembuatan produk dan analisis hasil akhir produk. Secara garis besar tahapan penelitian dan analisis yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2 Tahapan penelitian dan analisis produk yogurt dalam kemasan

### a Tahap pembuatan produk

Pembuatan produk dimulai dengan proses fermentasi untuk menghasilkan yogurt yang kemudian diproses lebih lanjut dengan proses pemanasan untuk inaktivasinya. Proses pembuatan produk dapat dilihat pada diagram alir Gambar 3.



Gambar 3 Tahapan pembuatan produk yogurt dalam kemasan *pouch*

## b Tahap analisis produk

Pada tahap ini akan dilakukan analisis produk dengan matriks analisis sebagai berikut:

Tabel 2 Matriks analisis produk yogurt

Jenis analisis	Sebelum inaktivasi termal	Setelah inaktivasi termal
Analisis Proksimat		
- Total padatan		
- Lemak	√	√
- Protein		
- Karbohidrat		
SCFA		
- Asetat	√	√
- Butirat		
- Propionat		
Peptida bioaktif	√	√

√ : analisis dilakukan

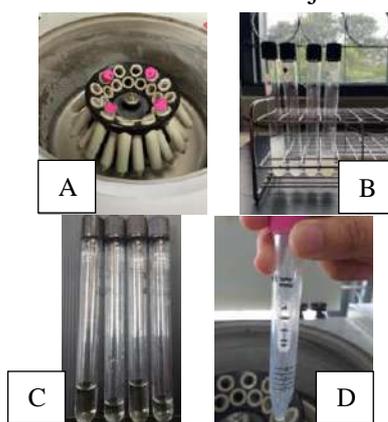
### 3.4 Prosedur Analisis

Prosedur analisis yang dilakukan dalam penelitian terdiri dari: analisis proksimat, analisis SCFA dan analisis peptida bioaktif pada yogurt.

#### 3.4.1 Analisis peptida bioaktif

##### 1) Fraksinasi supernatan

Sebanyak 40 g yogurt ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung *falcon* 50 ml lalu disentrifugasi (6000 rpm selama 15 menit, 4 °C). Supernatan yang dihasilkan kemudian disentrifugasi ulang menggunakan *filter tube* 10 kDa (3500 rpm, 30 menit, 4 °C). Supernatan hasil filtrasi < 10 kDa kemudian disentrifugasi ulang dengan parameter yang sama menggunakan *filter tube* berukuran 3 kDa. Hasil fraksinasi < 3 kDa kemudian dikumpulkan untuk diidentifikasi lebih lanjut.



Gambar 4 Tahapan fraksinasi supernatan (A) Sentrifugasi awal, (B) Supernatan hasil sentrifugasi awal, (C) Supernatan hasil filtrasi *filter tube* 10 kDa, dan (D) Supernatan hasil filtrasi *filter tube* 3 kDa

- 2) Identifikasi peptida  
Identifikasi peptida dilakukan menggunakan *Thermo Scientific™ Dionex™ Ultimate 3000 RSLCnano UHPLC coupled with Thermo Scientific™ Q Exactive™ High Resolution Mass Spectrometer*. Hasil fraksinasi dari preparasi sebelumnya yang memiliki berat molekul < 3 kDa difiltrasi dengan menggunakan filter ukuran 0,022 μm. Hasil filtrasi sebanyak 10 μL kemudian diinjeksikan ke sistem *Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)*. Peptida dianalisis dengan menggunakan *Proteomic Discoverer 2.2 software*.

- 3) Analisis bioaktivitas dan potensi manfaat kesehatan  
Analisis dilakukan dengan mengevaluasi keberadaan fragmen bioaktif pada sekuens peptida (A) serta nilai aktivitas biologis (B) tertentu dengan menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM. Berikut adalah cara untuk mengidentifikasi nilai A berdasarkan Minkiewicz *et al.* (2008) dapat dilihat pada persamaan 1.

$$A = \frac{a}{N} \quad (1)$$

Keterangan:

- A : frekuensi keberadaan fragmen bioaktif pada sekuens peptida  
a : jumlah fragmen dengan aktivitas tertentu pada sekuens peptida  
N : jumlah residu asam amino pada protein

Nilai B dapat dihitung dengan persamaan 2 sebagai berikut:

$$B = \frac{\sum_{i=1}^k \frac{a_i}{EC_{50i}}}{N} \quad (2)$$

Keterangan:

- B : nilai aktivitas biologis  
a<sub>i</sub> : jumlah keberulangan fragmen bioaktif pada sekuens peptida  
EC<sub>50</sub> : jumlah konsentrasi peptida bioaktif yang menghasilkan 50% dari maksimal aktivitasnya (mM)  
k : jumlah fragmen berbeda dengan aktivitas yang sama  
N : jumlah residu asam amino pada protein

### 3.4.2 Analisis SCFA

- 1) Analisis Asam Asetat (Metode uji asam organik secara UPLC, SIG 2021)  
Standar asam organik dibuat minimal 6 titik konsentrasi dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 – 1 g porsi uji ke dalam labu ukur 25 mL. Sampel ditambahkan buffer fosfat 20 mM hingga setengah volume labu ukur, dan dilakukan vorteks serta sonikasi. Sampel ditambahkan kembali buffer fosfat 20 mM hingga tanda tera dan dihomogenkan. Larutan sampel uji dipindahkan ke dalam tabung *falcon* 50 mL kemudian disentrifugasi. Supernatan di-*clean up* dengan SPE C18, kemudian saring eluat dengan *syringe filter* 0,2 μm ke dalam vial 2 mL. Eluat kemudian diinjeksikan ke dalam sistem UPLC. Kondisi pengukuran instrumen adalah sebagai berikut:

Kolom : *Reversed phase C18*  
 Fase gerak :  $\text{H}_3\text{PO}_4$  20 mM  
 Laju alir : 0,425 mL/menit  
 Sistem pompa : Isokratik  
 Volume injeksi : 10  $\mu\text{L}$   
 Suhu kolom : 37 °C  
 Detektor : PDA (190 – 400 nm),  $\lambda$  210 nm  
 Kadar asam organik dalam sampel dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar dengan persamaan garis:  $y = bx + a$ , dengan persamaan 3.

$$\text{Kadar asam organik} = \frac{(\text{Aspl} - a)}{b} \times \text{FP} \times V \quad (3)$$

Keterangan:

Aspl : area sampel uji  
 a : intersep dari kurva kalibrasi standar  
 b : slope dari kurva kalibrasi standar  
 FP : faktor pengenceran  
 V : volume akhir larutan uji  
 Wspl : bobot penimbangan porsi uji  
 Vspl : volume pemipetan porsi uji

2) Analisis Asam Propionat (Metode uji asam propionat secara GC, SIG 2021)

Larutan standar kerja dibuat dengan rentang minimal 6 titik konsentrasi dalam pelarut etil asetat. Sampel ditimbang sebanyak 2,5 g porsi uji dan dimasukkan ke dalam tabung *falcon* 50 mL. Sample ditambahkan asam fosfat dan etil asetat, kemudian dikocok dengan *shaker*. Larutan uji disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam labu ukur. Larutan uji ditambahkan dengan etil asetat, dan dikocok dengan menggunakan *shaker*. Larutan uji disaring ke dalam labu ukur 50 mL yang sama dengan menggunakan kertas saring dan bilas kertas saring menggunakan etil asetat, kemudian tera hingga batas dan dihomogenkan. Larutan uji kemudian dipipet ke dalam *vial* GC 2 mL, ditambahkan internal standar asam isovalerat dan dikocok dengan vorteks. Larutan uji kemudian diinjeksikan kedalam sistem GC-FID. Kondisi pengukuran instrumen adalah sebagai berikut:

**Inlet**

*Injection mode* : split  
*Injection temperature* : 220 °C

**Kolom**

*Capillary column* : DB-Wax  
*Carrier gas* : nitrogen

**Oven**

*Initial temperature* : gradien suhu 100 – 200 °C

**Detektor**

Suhu detektor : 225 °C

Kadar asam propionat dalam sampel dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar dengan persamaan garis:  $y = bx + a$ , dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Kadar asam propionat} = \frac{(\text{rasio area} - a)}{b} \times \text{volume akhir} \times \text{FP} \quad (4)$$

$$\text{Rasio area} = \frac{\text{Luas area analit}}{\text{Luas area internal standar}} \quad (5)$$

Keterangan:

a : intersep dari kurva kalibrasi standar

b : slope dari kurva kalibrasi standar

FP : faktor pengenceran

### 3) Analisis Asam Butirat (Metode uji asam lemak jenuh dan tidak jenuh secara GC, SIG 2022)

Larutan standar kerja dibuat sebanyak 1 titik konsentrasi *Fatty Acid Methyl Ester* (FAME) dalam pelarut heksana. Sampel dimasukkan secukupnya ke dalam tabung *falcon* 50 mL, dan ditambahkan KOH 0,5 M dan isopropanol kemudian divorteks. Sampel kemudian ditambahkan heksana dan dikocok dengan *mechanical shaker*. Sampel ditambahkan akuabides dan divorteks serta sentrifugasi. Lapisan atas sampel (fase organik) diambil dan dimasukkan ke dalam tabung ulir 10 mL dan diuapkan menggunakan gas nitrogen. Larutan uji ditambahkan larutan KOH dalam methanol dan divorteks kemudian dipanaskan dalam penangas air. Larutan kemudian didinginkan hingga suhu ruang dan ditambahkan larutan BF<sub>3</sub> dalam methanol dan divorteks. Larutan dipanaskan kembali dalam penangas air dan didinginkan dan ditambahkan dengan larutan NaCl jenuh dan heksana kemudian dikocok. Lapisan atas (fase organik) dipisahkan ke dalam *tube* 2 mL yang berisi Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat. Larutan dibiarkan dalam suhu ruang dan dimasukkan ke dalam *vial* GC 2 mL. Larutan uji kemudian diinjeksikan ke dalam sistem GC-FID. Kondisi pengukuran instrumen adalah sebagai berikut:

#### Inlet

*Injection mode* : split

*Injection volum* : 1 µL

*Injection temperature* : 225 °C

#### Kolom

*Capillary colum* : Supelco SP<sup>TM</sup> 2560

*Carrier gas* : nitrogen

#### Oven

*Oven program* : gradien suhu 100 – 240 °C

#### Detektor

Suhu detektor : 240 °C

Kadar asam lemak dalam sampel dapat diketahui dengan membandingkan waktu retensi komponen asam lemak dari sampel dengan waktu retensi setiap komponen asam lemak dari standar.

$$\text{Kadar asam lemak injeksi} = \frac{\text{Luas area komponen asam lemak}}{\text{Total luas area komponen asam lemak}} \times 100\% \quad (6)$$

$$\text{Kadar asam lemak} = \text{Kadar asam lemak injeksi} \times \text{Kadar lemak} \quad (7)$$

### 3.4.3 Analisis proksimat meliputi analisis total padatan, lemak, protein, dan karbohidrat.

#### 1) Analisis total padatan (AOAC 990.19, 2019)

Total padatan sampel ditentukan dengan menimbang sampel, mengeringkan, dan menimbang residu sampel yang telah dikeringkan.

Terlebih dahulu *aluminium dish* dimasukkan ke dalam oven bersuhu  $100 \pm 1$  °C selama  $\geq 2$  jam, kemudian disimpan di dalam desikator. *Aluminium dish* ditimbang dalam keadaan kosong ( $W$ ). Sampel sebanyak 3 g diletakan pada *aluminium dish* dan ditimbang ( $W_1$ ). Selanjutnya *aluminium dish* yang telah berisi sampel dikeringkan dalam oven bersuhu  $100 \pm 1$  °C selama 3 jam. Setelah 3 jam maka sampel dan *aluminium dish* didinginkan hingga suhu ruang di dalam desikator ( $\geq 30$  menit), kemudian ditimbang ( $W_2$ ). Rata-rata berat dua *aluminium dish* dihitung sebagai faktor koreksi ( $B$ ). Total padatan dalam sampel dihitung dengan persamaan:

$$\text{Total padatan} = \frac{(W_2 - W) - B}{(W_1 - W)} \times 100\% \quad (8)$$

Keterangan:

$W$  : berat *aluminium dish*

$W_1$  : berat sampel dan *aluminium dish* sebelum pengeringan

$W_2$  : berat sampel dan *aluminium dish* sesudah pengeringan

$B$  : Rata-rata berat dua *aluminium dish*

2) Analisis lemak (AOAC 989.05, 2019)

Analisis penetapan kadar lemak menggunakan metode Mojonnier. Tabung Mojonnier dikeringkan terlebih dahulu dengan metode pengeringan, kemudian disimpan di dalam desikator. Tabung Mojonnier ditimbang dalam keadaan kosong ( $W$ ). Sampel sebanyak 10 g dimasukan ke dalam tabung Mojonnier dan ditimbang ( $W_1$ ). Selanjutnya tambahkan 1,5 mL  $\text{NH}_4\text{OH}$  yang berfungsi untuk menetralkan asam dan melarutkan kasein. Sebanyak tiga tetes indikator *phenolphthalein* ditambahkan untuk membantu mempertajam penampakan larutan eter pada saat ekstraksi. Alkohol 95% ditambahkan sebanyak 10 mL dan diaduk selama 15 detik. Pada ekstraksi pertama ditambahkan 25 mL etil eter dan diaduk dengan cepat selama 1 menit, kemudian ditambahkan 25 mL petroleum eter dan diaduk dengan cepat selama 1 menit kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 600 rpm. Pada proses sentrifugasi dihasilkan dua lapisan, yaitu lapisan atas (supernatan) yang jernih dan lapisan bawah. Tahapan ekstraksi pada lapisan bawah dilakukan dua kali lagi untuk memperbesar ketelitian. Tahapan ekstraksi kedua dan ketiga sama seperti tahapan ekstraksi pertama hanya berbeda pada penambahan pereaksi. Pada ekstraksi kedua, lapisan bawah hasil ekstraksi pertama ditambahkan 5 mL alkohol 95% kemudian diaduk dengan cepat selama 15 detik. Kemudian ditambahkan 15 mL etil eter dan diaduk dengan cepat selama 1 menit, dan ditambahkan 15 mL *petroleum benzene* dan diaduk dengan cepat selama 1 menit. Pada ekstraksi ketiga penambahan pereaksinya sama dengan ekstraksi kedua. Supernatan dari setiap hasil ekstraksi dipanaskan di atas pemanas (*hot plate*) hingga hanya terdapat residu lemak. Selanjutnya dimasukan ke dalam oven vakum dengan suhu  $70 - 75$  °C selama 10 menit dan didinginkan di dalam desikator hingga mencapai berat konstan ( $W_2$ ). Setiap kali melakukan analisis lemak, dilakukan analisis residu blanko dimana perlakuannya sama dengan prosedur ekstraksi di atas, namun sampelnya diganti dengan 10 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Hasil ekstraksi air dihitung sebagai rata-rata berat residu blanko ( $B$ ).



Berat residu dinyatakan dalam persentase lemak yang terdapat dalam sampel susu dan dihitung dengan persamaan:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{(W_2 - W) - B}{W_1} \times 100 \quad (9)$$

Keterangan:

W : berat tabung kosong

W<sub>1</sub> : berat sampel dan tabung sebelum ekstraksi

W<sub>2</sub> : berat sampel dan tabung setelah ekstraksi

B : Rata-rata berat residu blanko

### 3) Analisis Protein (AOAC 991.20, 2019)

Analisis penetapan kadar protein menggunakan metode Kjeldahl. Sampel sebanyak 5 mL dimasukan ke dalam tabung destruksi kemudian ditimbang (W). Ditambahkan 15 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mL CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan 8 – 10 *boiling chips* kemudian diaduk. Sebanyak 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ditambahkan untuk membersihkan sisa sampel yang terdapat leher tabung destruksi. Pengaturan pemanas yang digunakan untuk destruksi protein dilakukan mendidihkan larutan 250 mL H<sub>2</sub>O (suhu 25 °C) selama 5 – 6 menit. Sampel pada tabung destruksi kemudian dipanaskan secara bertahap, dimulai pada suhu rendah selama 20 menit sampai timbul asap putih, kemudian dilanjutkan pada suhu tertinggi sesuai dengan pengaturan suhu pemanas selama 15 menit hingga destruksi berwarna hijau kebiruan. Lanjutkan pemanasan hingga 1 – 1,5 jam hingga jernih. Sampel kemudian didinginkan hingga suhu ruang dan tambahkan 300 mL H<sub>2</sub>O dan diaduk. Tahap selanjutnya yaitu destilasi, sampel yang sudah didinginkan ditambahkan 75 mL larutan NaOH 50% tanpa diaduk. Gas ammonia yang dihasilkan kemudian ditampung dengan menggunakan Erlenmeyer 500 mL yang berisi 50 mL H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> dengan indikator. Sampel dititrasi menggunakan HCl 0,1 M dan titik akhir titrasi ditandai dengan terbentuknya warna merah muda (V<sub>a</sub>). Penetapan blanko dilakukan dengan cara yang sama tanpa menggunakan sampel (V<sub>b</sub>). Adapun perhitungan kadar protein:

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{1,4007 \times (V_a - V_b) \times 0,1 \times 6,38}{W} \times 100 \quad (10)$$

Keterangan:

V<sub>a</sub> : volume HCl yang digunakan untuk titrasi sampel

V<sub>b</sub> : volume HCl yang digunakan untuk titrasi blanko

W : berat sampel dan tabung destruksi

### 4) Analisis Karbohidrat

Diperoleh secara *by difference* dari hasil pengurangan keseluruhan proksimat

## 3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan dalam tiga tahap, yaitu evaluasi pengaruh proses inaktivasi termal terhadap sekuens peptida serta potensi manfaat kesehatan peptida bioaktif, dan evaluasi pengaruh proses inaktivasi termal terhadap komponen asam lemak rantai pendek (SCFA). Pengaruh proses inaktivasi termal terhadap sekuens peptida dianalisis dengan mengidentifikasi sekuens peptida dan mengevaluasi bioaktivitasnya sebelum dan setelah proses inaktivasi termal. Analisis bioaktivitas

peptida mencakup penilaian keberadaan fragmen bioaktif pada sekuens peptida (A) serta penghitungan nilai aktivitas biologis (B) tertentu dengan menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>). Analisis lanjutan bioaktivitas peptida dilakukan menggunakan metode *Principal Component Analysis* (PCA) dan *Agglomerative Hierarchical Clustering* (AHC). Data SCFA sebelum dan setelah inaktivasi termal dianalisis menggunakan *two-sample t-test* dengan aplikasi XL-STAT.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



## IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengaruh Proses Inaktivasi Termal terhadap Sekuens Peptida

Peptida bioaktif adalah senyawa organik yang terdiri dari 2 hingga 20 asam amino dan memiliki potensi aktivitas biologis (Manzoor *et al.* 2022). Peptida ini dapat dihasilkan melalui fermentasi, dengan bioaktivitas yang bergantung pada sekuens peptida yang dihasilkan. Jenis bakteri yang digunakan dalam fermentasi memengaruhi sekuens peptida, karena bakteri berperan dalam reaksi proteolitik yang terjadi selama proses tersebut (Peredo-Lovillo *et al.* 2022).

#### 4.1.1 Sekuens Peptida

Peptida dengan berat molekul < 3 kDa diidentifikasi menggunakan LC-HRMS dan *software* proteomik. Penelitian ini menghasilkan 10 sekuens peptida yang ditemukan dalam yogurt sebelum dan setelah inaktivasi termal, dengan hasil disajikan di Tabel 3.

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa proses inaktivasi termal menyebabkan perubahan pada sekuens peptida dalam produk yogurt, di mana peptida baru yang berasal dari  $\kappa$ -casein (A0A140T8A9) dan  $\alpha$ -s1-casein (A0A4W2H1U3) terbentuk, sementara beberapa peptida yang berasal dari  $\kappa$ -casein (A0A140T8A9), *serine/threonine kinase* (F1MSZ0), dan *reverse transcriptase* (A0A4W2IJ09) hilang. Selain itu, proses inaktivasi termal tidak memengaruhi peptida yang berasal dari *glycosylation* (A0A4W2FPA7) dan  $\alpha$ -s2-casein (P02663). Proses ini juga menghasilkan sekuens peptida dengan rentang berat molekul yang lebih rendah, yaitu 831,49 – 1436,72 Da, dibandingkan dengan rentang berat molekul sebelum inaktivasi termal yang mencapai 831,49 – 4160,13 Da.

Penelitian oleh Rendon-Rosales *et al.* (2022) mengidentifikasi 11 sekuens peptida pada produk hasil fermentasi susu menggunakan bakteri *Lactobacillus lactis* NB-571. Sekuens peptida yang dihasilkan berasal dari  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\alpha$ -s1-casein,  $\alpha$ -s2-casein,  $\alpha$ -lactoalbumin, dan *serotransferrin*. Berat molekul sekuens peptida yang dihasilkan berada dalam rentang 592,3 – 1717 Da.

Proses pemanasan dapat mengubah konformasi protein sehingga menimbulkan disrupsi pada struktur protein dan menghasilkan peptida baru serta berpotensi meningkatkan bioaktivitasnya (Peredo-Lovillo *et al.* 2022). Proses pemanasan pada suhu 70 °C dapat meningkatkan proses disosiasi pada  $\kappa$ -casein namun menurunkan proses disosiasi pada  $\beta$ -casein dan  $\alpha$ -s-casein (Krishna *et al.* 2021). Protein minor merupakan komponen protein susu di luar fraksi protein utama yang memiliki potensi bioaktivitas (Wynn dan Sheehy 2013). Beberapa protein minor dikategorikan sebagai protein whey yang rentan terhadap proses pemanasan. Proses denaturasi dapat mengakibatkan fraksi protein whey membentuk komposit dengan  $\kappa$ -casein, dan mencegah terjadinya disosiasi  $\beta$ -casein dan  $\alpha$ -s-casein (Krishna *et al.* 2021).

Tabel 3 Sekuens peptida sebelum dan setelah proses inaktivasi termal

Protein	Sekuens peptida	m/z (Da)	MH+ (Da)	Berat Molekul (Da)	Waktu retensi (Min)		Sebelum inaktivasi	Setelah inaktivasi
					Sebelum inaktivasi	Setelah inaktivasi		
<i>κ</i> -casein (A0A140T8A9)	SPPEINTVQ	492,75	984,50	983,49	9,51		√	td
	FMAIPPKKN	349,20	1045,59	1044,58	15,53	14,15	√	√
	AVRSPAQIL	477,79	954,57	953,57	12,61	12,75	√	√
	GEPTSTPTXE	516,25	1031,49	1030,48		9,33	td	√
	QDKTEIPTIN	579,80	1158,60	1157,59		10,25	td	√
<i>Glycosylation</i> (A0A4W2FPA7)	DASAQFIR	454,24	907,46	906,46	9,50	9,47	√	√
	AQPTDASAQFIR	652,83	1304,66	1303,65	10,18	10,18	√	√
	ILNKPEDETHLE	479,91	1437,72	1436,72	13,70	13,36	√	√
<i>α</i> -s <sub>2</sub> -casein (P02663)	ALPQYLK	416,75	832,49	831,49	10,88	10,52	√	√
	ALPQYLKT	467,27	933,54	932,53	11,17	11,00	√	√
<i>Serine/threonine kinase</i> (F1MSZ0)	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHA	1825,61	3650,22	3649,21	1,14		√	td
	HISI							
	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGET	321,02	4161,13	4160,13	16,46		√	td
<i>Reverse transcriptase</i> (A0A4W2IJ09)	VETMSDFMF							
	DVPSERYL	489,75	978,49	977,48		11,00	td	√

A: Alanina, R: Arginina, N: Asparagina, D: Asam aspartat, E: Asam glutamat, Q: Glutamina, G: Glisina, H: Histidina, I: Isoleusina, L: Leusina, K: Lisina, M: Metionina, F: Fenilalanina, P: Prolina, S: Serina, T: Treonina, V: Valina, Y: Tirosina, X: tidak diketahui atau lainnya, √: teridentifikasi, td: tidak terdeteksi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peptida dari *glycosylation* dan  $\alpha$ -s2-*casein* tetap stabil setelah inaktivasi termal, sedangkan satu peptida dari  $\kappa$ -*casein* tidak terdeteksi, menunjukkan modifikasi struktural atau kerentanan. Peptida yang berasal dari fraksi protein minor juga tidak teridentifikasi setelah inaktivasi termal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata berat molekul peptida setelah proses inaktivasi termal lebih rendah dibandingkan sebelum proses inaktivasi termal. Peptida dengan berat molekul yang lebih rendah memiliki potensi aktivitas biologis yang lebih besar dibandingkan dengan peptida dengan berat molekul yang lebih besar (Guo *et al.* 2023).

#### 4.1.2 Bioaktivitas Peptida

Kajian hasil penelitian yang dilakukan oleh Manzoor *et al.* (2020) mengidentifikasi berbagai bioaktivitas yang dihasilkan dari produk fermentasi dengan substrat dan bakteri tertentu. Pertama, fermentasi kasein menggunakan bakteri *Lactobacillus helveticus* R0389 dan *Lactobacillus rhamnosus* R0011 menghasilkan aktiivitas ACE inhibitor (Adams *et al.* 2020). Kedua, fermentasi susu unta dengan bakteri *Lactobacillus lactis* KX881782 dan *Lactobacillus acidophilus* DSM9126 menghasilkan aktivitas bioaktif berupa *anticancer*, *antihypertensive*, *antidiabetic*, dan *antioxidant* (Ayyash *et al.* 2018), Ketiga, fermentasi susu sapi dengan bakteri *Lactobacillus plantarum* menunjukkan aktivitas bioaktif yang meliputi *antioxidant*, *antimicrobial*, *antihaemolytic*, *antimutagenic*, dan *anti-inflammatory* (Aguilar-Toala *et al.* 2017).

Pada penelitian ini, sekuens peptida yang dihasilkan dari analisis LC-HRMS dievaluasi lebih lanjut secara *in silico* menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM (data diakses: 14 Juli 2024). Hasil analisis *in silico* menunjukkan 23 jenis bioaktivitas pada produk yogurt, baik sebelum maupun setelah proses inaktivasi termal. Jenis bioaktivitas yang teridentifikasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 4 menunjukkan pengaruh proses inaktivasi termal terhadap bioaktivitas. Proses ini menyebabkan beberapa bioaktivitas menjadi tidak teridentifikasi, seperti *inhibitor of cytosol alanyl aminopeptidase*, *leucyltransferase inhibitor*, *pancreatic lipase inhibitor*, dan *xaa-pro inhibitor*. Di sisi lain, terdapat pula beberapa bioaktivitas baru yang berhasil diidentifikasi, seperti *antibacterial* dan *hypouricemic*. Hal ini mengindikasikan bahwa inaktivasi termal dapat mengubah profil bioaktivitas, baik dengan menghilangkan maupun menghasilkan sifat bioaktif baru.

Bioaktivitas peptida dipengaruhi oleh proses hidrolisis enzimatis, proses fermentasi serta proses kimia atau fisik (FitzGerald *et al.* 2020). Penelitian yang dilakukan menggunakan proses fermentasi serta proses fisik berupa proses inaktivasi termal. Proses termal dapat memengaruhi struktur protein sehingga berpengaruh pada peptida yang dihasilkan. Proses termal dapat meningkatkan bioaktivitas tertentu, meskipun dalam kasus lain proses termal tidak memberikan dampak pada bioaktivitas yang lain (Peredo-Lovillo *et al.* 2022).

Tabel 4 Bioaktivitas peptida sebelum dan setelah proses inaktivasi termal

Bioaktivitas peptida	Sebelum inaktivasi termal	Setelah inaktivasi termal
<i>ACE Inhibitor</i>	√	√
<i>Alpha-amylase inhibitor</i>	√	√
<i>Alpha-glucosidase inhibitor</i>	√	√
<i>Anti inflammatory</i>	√	√
<i>Antibacterial</i>	td	√
<i>Antioxidative</i>	√	√
<i>Antithrombotic</i>	√	√
<i>Bacterial permease ligand</i>	√	√
<i>CaMPDE inhibitor</i>	√	√
<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>	√	√
<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	√	√
<i>Inhibitor of cytosol alanyl aminopeptidase</i>	√	td
<i>Lactocepin inhibitor</i>	√	√
<i>Leucyltransferase inhibitor</i>	√	td
<i>Neuropeptide</i>	√	√
<i>Pancreatic lipase inhibitor</i>	√	td
<i>Renin inhibitor</i>	√	√
<i>Stimulating</i>	√	√
<i>Xaa-pro inhibitor</i>	√	td
<i>ACE2 inhibitor</i>	√	√
<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>	√	√
<i>Glutamate carboxypeptidase inhibitor</i>	√	√
<i>Hypouricemic</i>	td	√

√: teridentifikasi, td : tidak teridentifikasi

Total nilai A untuk potensi bioaktivitas tertentu memberikan gambaran tentang potensi aktivitas biologis peptida tersebut (Din *et al.* 2022). Penelitian yang dilakukan oleh Iwaniak *et al.* (2020), mengklasifikasikan nilai A menjadi tiga yaitu: (1) mayor dengan nilai  $A \geq 0,500$ ; (2) moderat dengan nilai  $A = 0,100 - 0,499$ , dan (3) minor dengan nilai  $A = 0,001 - 0,099$ . Peptida dengan nilai  $A \geq 0,500$  artinya memiliki jumlah fragmen aktif dengan potensi bioaktivitas, minimal sejumlah setengah dari total residu asam amino yang membentuk sekuens peptida. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar nilai A maka semakin besar potensi bioaktivitasnya. Peptida dengan nilai A moderat menunjukkan bahwa peptida tersebut memiliki potensi aktivitas biologis, namun potensinya lebih kecil dibandingkan dengan peptida dengan nilai A mayor. Peptida dengan nilai A minor menunjukkan bahwa peptida tersebut berpotensi kecil memiliki aktivitas biologis.

Evaluasi bioaktivitas peptida dilakukan dengan evaluasi potensi keberadaan fragmen bioaktif pada sekuens peptida (A) menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM (data diakses: 14 Juli 2024). Hasil evaluasi bioaktivitas peptida berdasarkan keberadaan fragmen bioaktif dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 Bioaktivitas peptida berdasarkan keberadaan fragmen bioaktif

Sekuens peptida	Bioaktivitas	A mayor	A moderat	A minor
SPPEINTVQ*	<i>ACE inhibitor</i>		0,3333	
	<i>Alpha-glucosidase inhibitor</i>		0,2222	
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1111	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,7778		
FMAIPPKN	<i>ACE inhibitor</i>	1,0000		
	<i>ACE2 inhibitor</i>		0,1111	
	<i>Alpha-glucosidase inhibitor</i>		0,2222	
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1111	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,5556		
	<i>Alpha-amylase inhibitor</i>		0,1111	
	<i>Anti inflammatory</i>		0,1111	
	<i>Antithrombotic</i>		0,3333	
<i>Bacterial permease ligand</i>		0,1111		
AVRSPAQIL	<i>ACE inhibitor</i>		0,4444	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,6667		
	<i>Neuropeptide Stimulating</i>		0,1111 0,1111	
GEPTSTPTXE**	<i>ACE inhibitor</i>	0,6000		
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1000	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,6000		
	<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>		0,1000	
	<i>Glutamate carboxypeptidase inhibitor</i>		0,1000	
QDKTEIPTIN**	<i>Hypouricemic</i>		0,3000	
	<i>ACE inhibitor</i>		0,4000	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,8000		
	<i>Antibacterial</i>		0,1000	
	<i>Hypouricemic</i>		0,2000	

Tabel 5 Bioaktivitas peptida berdasarkan klasifikasi nilai A (lanjutan)

Sekuens peptida	Bioaktivitas	A mayor	A moderat	A minor
DASAQFIR	<i>ACE inhibitor</i>		0,2500	
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1250	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>		0,3750	
	<i>Antioxidative</i>		0,1250	
	<i>CaMPDE inhibitor</i>		0,1250	
	<i>Renin inhibitor</i>		0,2500	
	<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>		0,1250	
AQPTDASAQFIR	<i>ACE inhibitor</i>		0,3333	
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>			0,0833
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,5000		
	<i>Antioxidative</i>			0,0833
	<i>CaMPDE inhibitor</i>			0,0833
	<i>Renin inhibitor</i>		0,1667	
	<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>			0,0833
ILNKPEDETHLE	<i>Hypouricemic</i>			0,0833
	<i>ACE inhibitor</i>		0,4167	
	<i>Alpha-glucosidase inhibitor</i>			0,0833
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1667	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,5000		
	<i>Antioxidative</i>		0,1667	
	<i>Neuropeptide</i>			0,0833
<i>Stimulating</i>			0,0833	
ALPQYLK	<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>			0,0833
	<i>ACE inhibitor</i>	0,5714		
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1429	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,8571		
	<i>Antioxidative</i>		0,2857	

Tabel 5 Bioaktivitas peptida berdasarkan klasifikasi nilai A (*lanjutan*)

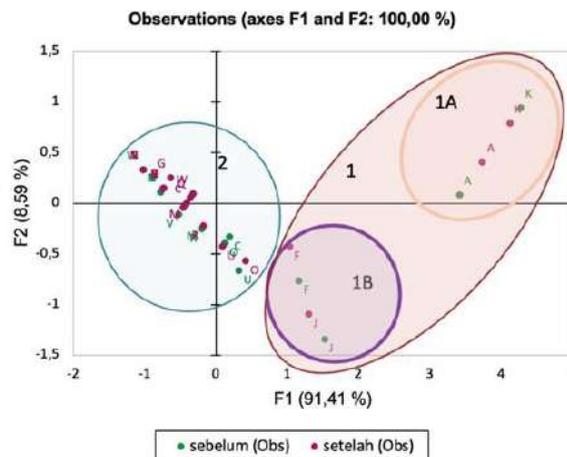
Sekuens peptida	Bioaktivitas	A mayor	A moderat	A minor
ALPQYLK	<i>Neuropeptide</i>		0,1429	
	<i>Lactocepin inhibitor</i>		0,1429	
ALPQYLKT	<i>ACE inhibitor</i>	0,5000		
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1250	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,8750		
	<i>Antioxidative</i>		0,3750	
	<i>Neuropeptide</i>		0,1250	
	<i>Lactocepin inhibitor</i>		0,1250	
EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI*	<i>ACE inhibitor</i>		0,3871	
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>			0,0323
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,6774		
	<i>Antioxidative</i>			0,0968
	<i>Stimulating</i>			0,0645
	<i>Inhibitor of cytosol alanyl aminopeptidase</i>			0,0323
	<i>Lactocepin inhibitor</i>			0,0323
	<i>Leucyltransferase inhibitor</i>			0,0323
	<i>Xaa-pro inhibitor</i>			0,0323
	<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>			0,0323
<i>Glutamate carboxypeptidase inhibitor</i>			0,0323	
KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF*	<i>ACE inhibitor</i>		0,3243	
	<i>Alpha-glucosidase inhibitor</i>			0,0700
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>			0,0541
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	0,6486		
	<i>Antioxidative</i>			0,0541
	<i>Pancreatic lipase inhibitor</i>			0,0270
	<i>Glutamate carboxypeptidase II inhibitor</i>			0,0541
	<i>Glutamate carboxypeptidase inhibitor</i>			0,0270

Tabel 5 Bioaktivitas peptida berdasarkan klasifikasi nilai A (*lanjutan*)

Sekuens peptida	Bioaktivitas	A mayor	A moderat	A minor
DVPSERYL**	<i>ACE inhibitor</i>	0,7500		
	<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>		0,1250	
	<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>		0,3750	
	<i>Antioxidative</i>		0,3750	
	<i>Neuropeptide</i>		0,1250	
	<i>Stimulating</i>		0,1250	

\*sekuens peptida hilang setelah proses inaktivasi termal, \*\*sekuens peptida baru setelah proses inaktivasi termal

Analisis bioaktivitas peptida pada yogurt dilakukan menggunakan metode PCA dan AHC dengan aplikasi XLSTAT. Analisis ini mengelompokkan potensi bioaktivitas berdasarkan nilai A dan jumlah sekuens peptida.



Gambar 5 Bioaktivitas berdasarkan frekuensi keberadaan fragmen bioaktif dan jumlah sekuens peptida. Kluster 1-bioaktivitas peptida dominan, Kluster 2-bioaktivitas peptida tidak dominan. A-*ACE inhibitor*, F-*antioxidative*, J-*DPP III inhibitor*, K-*DPP IV inhibitor*

Hasil analisis pada pada Gambar 5 memperlihatkan dua kluster potensi bioaktivitas. Kluster 1 menunjukkan profil frekuensi keberadaan fragmen bioaktif serta jumlah sekuens peptida yang lebih tinggi dibandingkan dengan kluster 2. Analisis kluster menunjukkan bahwa kluster 1 memiliki bioaktivitas yang lebih dominan dibandingkan dengan kluster 2. Potensi bioaktivitas dominan adalah *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor* (kluster 1A); serta *DPP III inhibitor* dan *antioxidative* (kluster 1B).

Identifikasi potensi bioaktivitas dominan dengan menggunakan metode klustering mengonfirmasi beberapa penelitian sebelumnya mengenai bioaktivitas yang ditemukan pada protein susu dan juga produk hasil fermentasi susu (Barati *et al.* 2020; FitzGerald *et al.*2020; Peredo-Lovillo *et al.* 2022; Manzoor *et al.* 2022; Guo *et al.* 2023). Aplikasi proses fisik salah satunya adalah proses pemanasan dapat memengaruhi bioaktivitas baik meningkatkan, menurunkan maupun tidak memberikan efek pada bioaktivitas (Peredo-Lovillo *et al.* 2022).

Analisis lanjutan membandingkan nilai A sebelum dan setelah proses inaktivasi termal pada empat bioaktivitas dominan yang teridentifikasi. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 6.

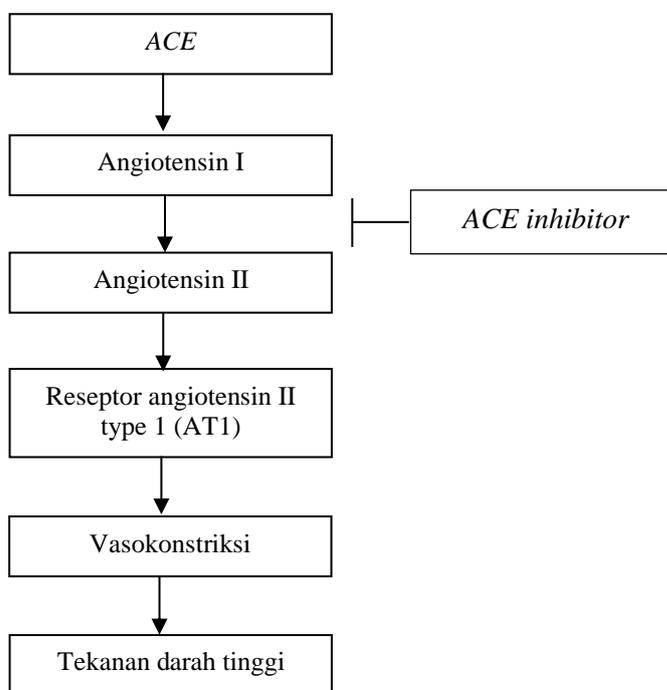
Tabel 6 Frekuensi keberadaan fragmen bioaktif peptida sebelum dan setelah proses inaktivasi termal

Bioaktivitas	Sebelum inaktivasi termal	Setelah inaktivasi termal
<i>ACE inhibitor</i>	4,5605	5,2658
<i>DPP IV inhibitor</i>	6,4332	6,1004
<i>DPP III inhibitor</i>	0,9515	0,9790
<i>Antioxidative</i>	1,1886	1,4107

Hasil analisis pada Tabel 6 menunjukkan bahwa proses inaktivasi termal dapat meningkatkan potensi bioaktivitas *ACE inhibitor*, *DPP III inhibitor*, dan *antioxidative* produk yogurt. Total nilai A untuk ketiga bioaktivitas ini lebih tinggi setelah proses inaktivasi termal. Proses inaktivasi termal dapat menurunkan potensi bioaktivitas *DPP IV inhibitor* produk yogurt. Total nilai A pada bioaktivitas *DPP IV inhibitor* lebih rendah setelah proses inaktivasi termal.

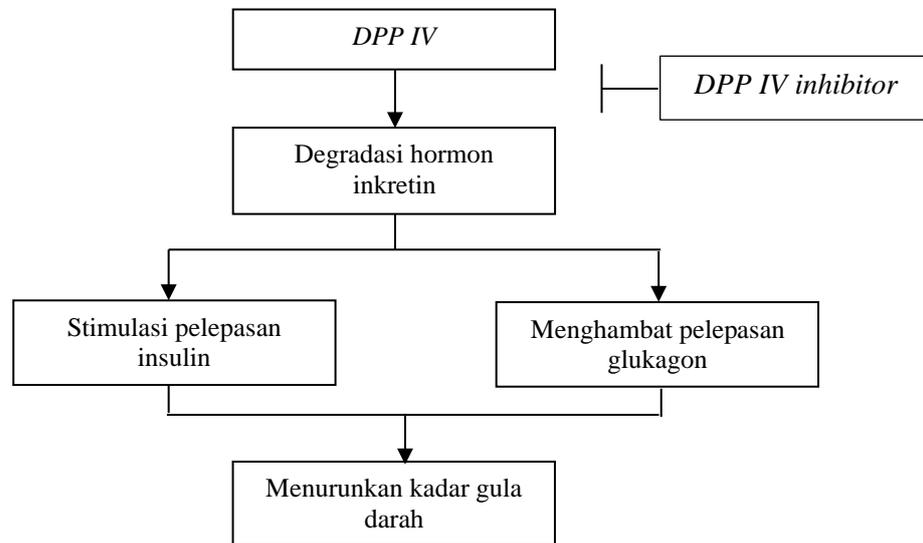
Berdasarkan hasil analisis sekuens dan bioaktivitas peptida, efek proses inaktivasi termal terhadap peptida bioaktif dapat dirangkum sebagai berikut. Pertama, proses inaktivasi termal meningkatkan keragaman peptida dengan berat molekul lebih rendah dibandingkan dengan kondisi sebelum inaktivasi. Kedua, proses ini juga memunculkan potensi bioaktivitas baru, seperti *antibacterial* dan *hypouricemic*. Ketiga, setelah inaktivasi termal, ditemukan empat bioaktivitas dominan, yaitu *ACE inhibitor*, *DPP IV inhibitor*, *DPP III inhibitor*, dan *antioxidative*. Keempat, inaktivasi termal diketahui meningkatkan frekuensi keberadaan fragmen bioaktif pada bioaktivitas *ACE inhibitor*, *DPP III inhibitor*, dan *antioxidative*. Namun, kelima, proses inaktivasi ini menurunkan frekuensi keberadaan fragmen bioaktif pada bioaktivitas *DPP IV inhibitor*. Hal ini menunjukkan bahwa inaktivasi termal secara *in silico* memiliki dampak terhadap karakteristik bioaktivitas peptida.

Penelitian menunjukkan bahwa peptida bioaktif memiliki potensi sebagai *ACE inhibitor*, *DPP IV inhibitor*, *DPP III inhibitor*, dan *antioxidative*. *ACE inhibitor* berperan dalam menurunkan tekanan darah dengan menghambat enzim pengubah angiotensin, sehingga mencegah pembentukan angiotensin II yang bersifat vasokonstriktor (Manzoor *et al.* 2022). Mekanisme kerja *ACE inhibitor* dalam menurunkan tekanan darah dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6 Mekanisme kerja *ACE inhibitor* dalam pencegahan tekanan darah tinggi (sumber: Do *et al.* 2014)

*DPP IV inhibitor* mengatur glukosa darah dengan mencegah degradasi hormon inkretin, sehingga meningkatkan sekresi insulin dan kontrol glikemik (Manzoor *et al.* 2022). Mekanisme kerja *DPP IV* dalam mengatur glukosa darah dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7 Mekanisme kerja *DPP IV* inhibitor dalam mengatur kadar glukosa darah (sumber: Saini *et al.* 2023)

Selain itu, *DPP III inhibitor* berfungsi menghambat pemecahan enkephalin, sebuah peptida yang berperan sebagai regulator rasa nyeri (Khaket *et al.* 2015). *Antioxidative* berperan dalam mengurangi proses oksidatif melalui mekanisme seperti pengikatan ion logam, penangkalan radikal bebas, peredaman oksigen singlet, serta bertindak sebagai donor hidrogen dan penghambat peroksidasi lipid (Manzoor *et al.* 2022).

#### 4.1.3 Potensi Manfaat Kesehatan Peptida

Perhitungan nilai potensi aktivitas biologis (B) bergantung pada nilai  $EC_{50}/IC_{50}$ , tetapi nilai ini tidak selalu tersedia dalam aplikasi BIOPEP-UWM (Minkiewicz *et al.* 2019). Berdasarkan data yang diakses pada 14 Juli 2024, nilai B untuk bioaktivitas *DPP III inhibitor* dan *antioxidative* belum teridentifikasi karena nilai  $EC_{50}/IC_{50}$  yang belum diketahui. Oleh karena itu, analisis potensi manfaat kesehatan dalam penelitian ini dilakukan untuk bioaktivitas *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*, karena nilai A dan B untuk kedua bioaktivitas tersebut sudah tersedia.

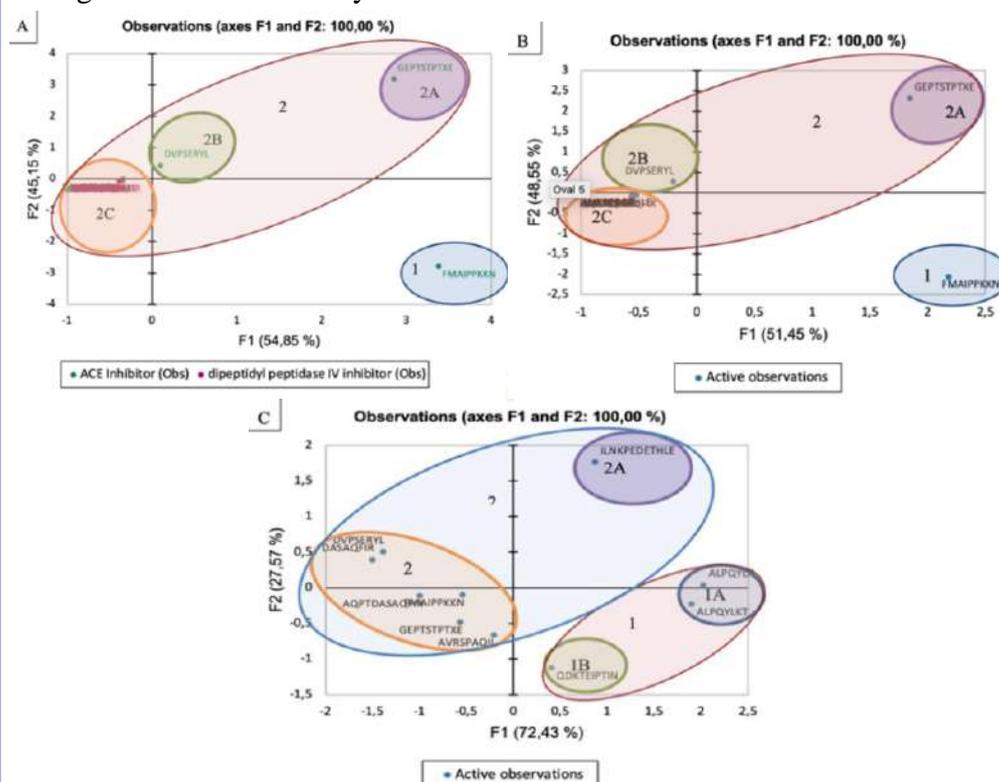
##### Bioaktivitas Dominan

Analisis bioaktivitas dominan setelah proses inaktivasi termal dilakukan dengan mengkluster nilai A dan B pada sekuens peptida yang teridentifikasi menggunakan metode PCA dan AHC pada aplikasi XLSTAT. Hasil analisis yang ditampilkan pada Gambar 8A menunjukkan adanya tiga peptida bioaktif dominan dengan profil kombinasi nilai A dan B yang lebih tinggi dibandingkan dengan kluster lain. Peptida bioaktif dominan tersebut adalah FMAIPPCKN, GEPTSTPTXE, dan DVPSERYL. Ketiga peptida ini teridentifikasi sebagai dominan untuk bioaktivitas *ACE inhibitor*. Peptida dengan bioaktivitas *ACE*

*inhibitor* menunjukkan potensi manfaat kesehatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan peptida dengan bioaktivitas *DPP IV inhibitor* secara *in silico*.

### Peptida Bioaktif Dominan

Analisis lanjutan dilakukan untuk mengevaluasi peptida bioaktif dominan dalam bioaktivitas *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*. Klastering peptida bioaktif berdasarkan nilai A dan B pada kedua bioaktivitas dilakukan menggunakan metode PCA dan AHC. Hasil analisis menunjukkan bahwa peptida bioaktif dominan untuk bioaktivitas *ACE inhibitor* adalah FMAIPPKN, GEPTSTPTXE, dan DVPSERYL (Gambar 8B). Dan peptida bioaktif dominan untuk bioaktivitas *DPP IV inhibitor* adalah ILNKPEDETHLE, ALPQYLK, ALPQYLKT, dan QDKTEIPTIN (Gambar 8C). Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah proses inaktivasi termal, terdapat tiga peptida bioaktif baru yang teridentifikasi sebagai peptida bioaktif dominan secara *in silico* yaitu GEPTSTPTXE, DVPSERYL, dan QDKTEIPTIN. Temuan ini sejalan dengan penelitian oleh Peredo-Lovillo *et al.* (2022), yang menunjukkan bahwa proses pemanasan dapat meningkatkan pelepasan peptida bioaktif, sehingga berpotensi meningkatkan bioaktivitasnya.



Gambar 8 Peptida bioaktif pada bioaktivitas dominan (A) Peptida bioaktif dominan pada bioaktivitas *ACE inhibitor* (B) Peptida bioaktif dominan pada bioaktivitas *DPP IV inhibitor* (C)

### Identifikasi Fragmen Bioaktif

Identifikasi potensi manfaat kesehatan dilakukan dengan melakukan profil fragmen bioaktif dalam sekuen peptida (Minkiewicz *et al.* 2008). Hasil identifikasi fragmen bioaktif dilakukan secara *in silico* menggunakan aplikasi BIOPEP-UWM (data diakses: 14 Juli 2024) dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7 Fragmen peptida bioaktif sebagai *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*

Bioaktivitas	Sekuens peptida	Fragmen bioaktif
<i>ACE inhibitor</i>	FMAIPPKKN	IPP, AIP, IP, AI, PPK, AIPP, PP, MAIPPK, MAIPPKK
	GEPTSTPTXE	GEP, GE, PT, TP, ST
	DVPSERYL	RY, YL, VP, VPSERYL, RYL, ER
<i>DPP IV inhibitor</i>	ILNKPEDETHLE	KP, HL, ET, IL, LN, TH
	ALPQYLK	LP, AL, PQ, QY, YL, LPQ
	ALPQYLKT	LP, AL, PQ, QY, YL, LPQ
	QDKTEIPTIN	IP, EI, IN, KT, PT, QD, TE, TI

Keterangan: A=Alanin; R=Arginin; N=Asparagina; D=Asam aspartat; E=Asam glutamat; Q=Glutamina; G=Glisina; H=Histidina; I=Isoleusina; L=Leusina; K=Lisina; M=Metionina; F=Fenilalanina; P=Prolina; S=Serina; T=Treonina; V=Valina; Y=Tirosina

Fragmen bioaktif hasil identifikasi dapat digunakan sebagai dasar untuk mengonfirmasi bioaktivitas peptida bioaktif yang terdapat pada produk yogurt hasil proses termal. Saat ini sudah terdapat dua produk komersial yang mengandung tripeptida berupa VPP dan IPP dengan klaim aktivitas biologis sebagai *ACE inhibitor* yang dipasarkan di Jepang dan Finlandia. Kedua produk tersebut merupakan produk hasil fermentasi menggunakan bakteri *Lactobacillus helveticus* dan *Streptococcus cerevisiae* (Jepang), dan *Lactobacillus helveticus LBK-16H* (Finlandia) (Korhonen dan Pihlanto 2006).

#### 4.2 SCFA dan Pengaruh Proses Pemanasan

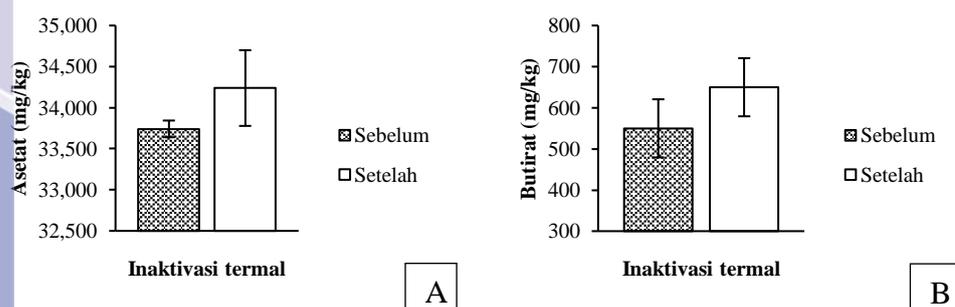
Proses fermentasi karbohidrat menghasilkan produk samping berupa asam karboksilat rantai pendek seperti asetat, laktat, butirat, propionat yang dikenal dengan SCFA. SCFA merupakan salah satu metabolit yang dihasilkan selama proses fermentasi. SCFA adalah asam organik yang memiliki rantai karbon kurang dari enam. SCFA yang paling dominan adalah asetat (C<sub>2</sub>), propionat (C<sub>3</sub>), dan butirat (C<sub>4</sub>) (Fusco *et al.* 2023). Jenis SCFA yang dihasilkan dari proses fermentasi bergantung pada jalur metabolisme, substrat yang terfermentasi dan spesies bakterinya (Markowiak-Kopec dan Slizewska 2020; Park *et al.* 2022; Fusco *et al.* 2023).

Penelitian ini melibatkan proses termal, sehingga karakterisasi sampel dilakukan dengan dua perlakuan yaitu sebelum dan setelah proses inaktivasi termal. Hasil analisis SCFA (asetat, butirat dan propionat) dapat dilihat pada Tabel 8 sebagai berikut:

Tabel 8 Komposisi SCFA pada sampel yogurt

Komponen SCFA	Sebelum inaktivasi termal (mg/kg)	Setelah inaktivasi termal (mg/kg)
Asetat	33.741,77 ± 101,78 <sup>a</sup>	34.238,99 ± 460,69 <sup>a</sup>
Butirat	550,00 ± 70,71 <sup>a</sup>	650,00 ± 70,71 <sup>b</sup>
Propionat	td	td

Superskrip yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antar sampel, td: hasil analisis tidak terdeteksi.



Gambar 9 Komposisi SCFA sebelum dan setelah proses inaktivasi termal dengan standar deviasi (A) Asetat, dan (B) Butirat

Penelitian yang dilakukan oleh Li *et al.* (2022) dan Wu *et al.* (2023) menunjukkan kadar asetat pada susu segar sekitar 0,26 – 3,50 mg/kg; propionat sekitar 0,05 – 0,19 mg/kg; dan butirat sekitar 1,02 – 15,46 mg/kg. Hasil analisis pada produk yogurt menunjukkan SCFA yang teridentifikasi adalah asetat dan butirat, baik dengan perlakuan sebelum maupun setelah proses inaktivasi termal. Kadar asetat yang teridentifikasi pada sampel yogurt lebih besar dari butirat. Propionat tidak teridentifikasi pada hasil analisis baik sebelum dan setelah proses inaktivasi termal.

Hasil analisis pada Tabel 8 menunjukkan bahwa setelah inaktivasi termal, kadar asetat dan butirat meningkat. Uji *two-sample t-test* (aplikasi XLSTAT) pada kadar asetat sebelum dan sesudah inaktivasi termal tidak signifikan ( $p > 0,05$ ), sementara kadar butirat menunjukkan perbedaan signifikan ( $p = 0,05$ ). Propionat tidak terdeteksi, hal ini dapat disebabkan karena substrat yang dibutuhkan tidak tersedia dan bakteri yang digunakan tidak mendukung pembentukannya.

Penelitian yang dilakukan oleh LeBlanc *et al.* (2017) menunjukkan bahwa jenis bakteri berbeda akan menghasilkan jenis SCFA yang berbeda. Penelitian tersebut menggunakan empat jenis probiotik yaitu: *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 dan *Lactobacillus gasseri* PA 16/8. LGG dapat menghasilkan propionat dalam jumlah yang signifikan yaitu 89  $\mu\text{M}$ , tetapi tidak menghasilkan butirat maupun asetat. *Bifidobacterium longum* SP, *Bifidobacterium bifidum* MF dapat menghasilkan asetat dalam jumlah yang signifikan. *Bifidobacterium longum* SP, *Bifidobacterium bifidum* MF dan *Lactobacillus gasseri* PA dapat menghasilkan propionat dalam jumlah yang signifikan tetapi tidak menghasilkan butirat.

Pembentukan propionat secara umum memerlukan *Propionibacterium* dengan menggunakan jalur Wood-weckerman (Gonzalez-Garcia *et al.* 2017). Jalur pembentukan ini tidak ditemukan pada fermentasi yogurt menggunakan *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Chang *et al.* (2022) mengenai karakterisasi komponen SCFA pada produk yogurt disampaikan bahwa jalur pembentukan propionat dari *Lactobacillus* belum diketahui.

Peningkatan kadar asetat dan butirat pada yogurt sesuai dengan penelitian Khan *et al.* (2017), yang menemukan bahwa pasteurisasi dan perebusan meningkatkan konsentrasi SCFA pada susu sapi dan kerbau. Pemanasan diindikasikan mengubah asam lemak rantai panjang (LCFA) menjadi fragmen lebih kecil seperti SCFA dan asam lemak rantai sedang (MCFA). Asetat diproduksi oleh sebagian

besar bakteri asam laktat, sedangkan propionat, butirat, dan laktat memerlukan jalur metabolisme, bakteri, dan substrat spesifik (Morrison dan Preston 2016; Markowiak-Kopec dan Slizewska 2020).

### 4.3 Proksimat dan Pengaruh Proses Pemanasan

Karakteristik dasar produk yogurt dianalisis dengan beberapa parameter uji seperti total padatan, lemak, protein dan karbohidrat. Penelitian ini melibatkan proses inaktivasi termal, sehingga karakterisasi sampel dilakukan dengan dua perlakuan yaitu sebelum dan setelah proses inaktivasi termal. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 9 sebagai berikut:

Tabel 9 Komposisi proksimat pada produk yogurt

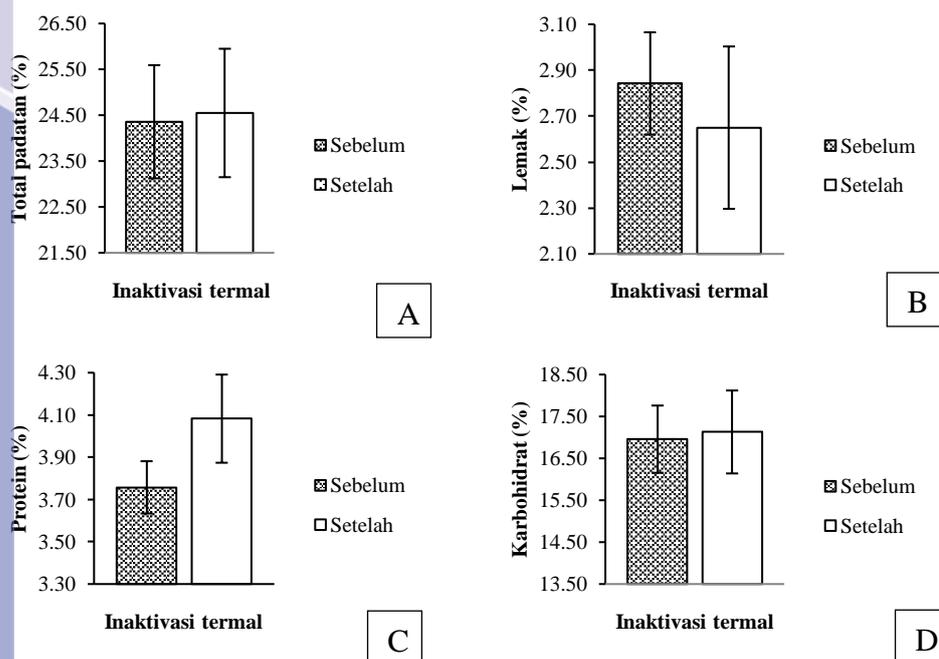
Jenis analisis	Sebelum inaktivasi termal (%)	Setelah inaktivasi termal (%)
Total Padatan	24,36 ± 1,23 <sup>a</sup>	24,55 ± 1,40 <sup>a</sup>
Lemak	2,84 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,65 ± 0,35 <sup>a</sup>
Protein	3,76 ± 0,12 <sup>a</sup>	4,08 ± 0,21 <sup>a</sup>
Karbohidrat	16,96 ± 0,8 <sup>a</sup>	17,13 ± 0,99 <sup>a</sup>

Superskrip yang sama dalam baris yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) antar sampel

Total padatan pada produk yogurt merupakan komponen dalam bentuk padatan pada produk yogurt yang berasal dari padatan susu (protein, lemak, laktosa, mineral), sukrosa dan bahan tambahan pangan lain yang digunakan dalam formulasi. Hasil analisis total padatan menunjukkan rentang total padatan sebelum proses inaktivasi termal adalah 23,13 – 25,59%, sedangkan setelah proses inaktivasi termal adalah 23,15 – 25,95%. Analisis signifikansi dilakukan dengan aplikasi XLSTAT menggunakan metode *two-sample t-test*. Hasil analisis data total padatan sebelum dan setelah proses inaktivasi termal tidak menunjukkan perbedaan signifikan ( $p$  value > 0,05).

Lemak pada produk yogurt berasal dari susu segar, dan susu bubuk lemak penuh yang digunakan dalam formulasi. Hasil analisis lemak menunjukkan rentang kadar lemak sebelum proses inaktivasi termal adalah 2,62 – 3,06 %, sedangkan setelah proses inaktivasi termal adalah 2,30 – 3,00%. Analisis signifikansi dilakukan dengan aplikasi XLSTAT menggunakan metode *two-sample t-test*. Hasil analisis kadar lemak sebelum dan setelah proses inaktivasi termal tidak menunjukkan perbedaan signifikan ( $p$  value > 0,05).

Protein pada produk yogurt berasal dari susu segar, susu skim bubuk, dan susu bubuk lemak penuh yang digunakan dalam formulasi. Hasil analisis protein menunjukkan rentang kadar protein sebelum proses inaktivasi termal adalah 3,64 – 3,88%, sedangkan setelah proses inaktivasi termal adalah 3,87 – 4,29%. Analisis signifikansi dilakukan dengan aplikasi XLSTAT menggunakan metode *two-sample t-test*. Hasil analisis kadar protein sebelum dan setelah proses inaktivasi termal tidak menunjukkan perbedaan signifikan ( $p$  value > 0,05).



Gambar 10 Komposisi proksimat produk yogurt sebelum dan setelah proses inaktivasi termal dengan standar deviasi (A) Total padatan, (B) Lemak, (C) Protein, dan (D) Karbohidrat

Karbohidrat pada produk yogurt yang dianalisis berasal dari sukrosa, dan laktosa. Laktosa adalah gula yang terdapat pada bahan baku susu yang ditambahkan dalam formulasi. Hasil analisis karbohidrat menunjukkan rentang kadar karbohidrat sebelum proses inaktivasi termal adalah 16,16 – 17,76 %, sedangkan setelah proses inaktivasi termal adalah 16,14 – 18,12%. Analisis signifikansi dilakukan dengan aplikasi XLSTAT menggunakan *two-sample t-test*. Hasil analisis kadar karbohidrat sebelum dan setelah proses inaktivasi termal tidak menunjukkan perbedaan signifikan ( $p \text{ value} > 0,05$ ).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proses termal tidak memengaruhi hasil analisis proksimat produk yogurt. Hasil analisis total padatan, lemak, protein dan karbohidrat tidak menunjukkan perbedaan signifikan secara statistik ( $p \text{ value} > 0,05$ ) pada dua perlakuan yang berbeda. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Alakali *et al.* (2009) mengenai efek pemanasan terhadap kualitas yogurt. Penelitian menunjukkan hasil analisis kadar lemak, kadar protein, kadar abu, dan kadar air pada produk yogurt yang dipanaskan tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan kontrol sebelum pemanasan.

## V SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Proses pemanasan pada yogurt yang difermentasi oleh *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dan *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* dapat meningkatkan keragaman peptida bioaktif dengan berat molekul lebih rendah. Pemanasan juga berpotensi menghasilkan empat bioaktivitas dominan yaitu menghasilkan empat bioaktivitas dominan yaitu *Angiotensin Converting Enzyme (ACE) inhibitor*, *dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitor*, *dipeptidyl peptidase (DPP) III inhibitor*, dan *antioxidative*. meningkatkan pelepasan peptida dengan aktivitas *ACE inhibitor* berdasarkan analisis *in silico*. Selain itu, pemanasan dapat meningkatkan kadar SCFA (asetat dan butirrat) dengan mengubah LCFA menjadi SCFA dan MCFA.

Evaluasi manfaat kesehatan secara *in silico* yang dilakukan dengan mengidentifikasi fragmen bioaktif dan potensi aktivitas biologis menunjukkan bahwa bioaktivitas yang paling dominan adalah *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*. Peptida bioaktif utama dengan aktivitas *ACE inhibitor* adalah FMAIPPKN, DVPSERYL, dan GEPTSTPTXE; sedangkan untuk *DPP IV inhibitor* adalah ILNKPEDETHLE, ALPQYLK, ALPQYLKT, dan QDKTEIPTIN. Proses termal juga menghasilkan tiga peptida bioaktif baru yang berkontribusi terhadap aktivitas *ACE inhibitor* dan *DPP IV inhibitor*, yaitu GEPTSTPTXE, DVPSERYL, dan QDKTEIPTIN.

### 5.2 Saran

Penelitian ini memiliki potensi untuk menjadi dasar bagi penelitian lanjutan, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, guna mengidentifikasi komponen probiotik melalui variasi proses yang berbeda serta mengonfirmasi manfaat kesehatan yang telah teridentifikasi. Penelitian lanjutan juga dapat difokuskan pada kajian terhadap peptida bioaktif dengan berat molekul lebih besar dari 10 kDa. Selain itu, diperlukan konfirmasi lebih lanjut melalui analisis sekuen peptida secara lebih rinci untuk memperkuat hasil penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adams C, Sawh F, Green-Johnson JM, Jones Taggart J, Strap JL. 2020. Characterization of casein-derived peptide bioactivity: differential effects on angiotensin-converting enzyme inhibition and cytokine and nitric oxide production. *J Dairy Sci.* 103(7):5805–5815. DOI:10.3168/jds.2019-17976.
- Aguilar-Toala JE, Santiago-Lopez L, Peres C.M, Peres C, Garcia HS, Vallejo-Cordoba B, Gonzalez-Cordova AF, Hernandez-Mendoza A. 2017. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *Journal of Dairy Science.* 100(1):65–75. DOI:10.3168/jds.2016-11846.
- Aguilar-Toala JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordona B, Hernández-Mendoza A. 2018. Postbiotics: an evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci Technol.* 75:105-114. DOI:10.1016/j.tifs.2018.03.009.
- Alakali JS, Ikechukwu UN, Ejiga O. 2009. Effect of milk blends and temperature on the quality of thermised yogurt. *EJEAFChe.* 8:676-684.
- Amin MA, Chondra U, Mostafa E, Alam MM. 2022. Green seaweed *Ulva lactuca*, a potential source of bioactive peptides revealed by in silico analysis. *IMU.* 33:101099. DOI: 10.1016/j.imu.2022.101099.
- Ayyash M, Al-Dhaheeri AS, Al Mahadin S, Kizhakkayil J, Abushelaibi A. 2018. In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: a comparative study with fermented bovine milk. *J Dairy Sci.* 101(2):900–911. DOI:10.3168/jds.2017-13400
- [AOAC] Association of Official Agricultural Chemists. 2019. The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence: Official Methods of Analysis of AOAC International. Edisi Tahun 2019. Washington DC (WA): AOAC Inc.
- Barati M, Javanmardi F, Jabbari M, Mokari-Yamchi A, Farahmand F, Es I, Farhadnejad H, Davoodi SH, Khaneghah AM. 2020. An in silico model to predict and estimate digestion-resistant and bioactive peptide content of dairy products: A primarily study of time-saving and affordable method for practical research. *LWT.* 130:109616. DOI:10.1016/j.LWT.2020.109616.
- Barati M, Jabbari M, Davoodi SH. 2023. Chapter 6 – In-silico methods for milk-derived bioactives prediction. Di dalam: Rajput YS, Sharma R, editor. *Foundation and Frontiers in Enzymology, Enzymes Beyond Traditional Applications in Dairy Science and Technology.* Cambridge: Academic Press. hlm 137-162.
- Bourebaba Y, Marycz K, Mularczyk M, Bourebaba L. 2022. Postbiotics as potential new therapeutic agents for metabolic disorder management. *Biomed.* 153:113138. DOI:10.1016/j.biopha.2022.113138.
- [BPOM] Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2023. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 13 tahun 2023 tentang Kategori Pangan. Jakarta: BPOM.

- Chang YH, Jeong CH, Cheng WN, Choi Y, Shin DM, Lee S, Han SG. 2021. Quality characteristics of yogurt fermented with short-chain fatty acid-producing probiotics and their effects on mucin production and probiotic adhesion onto human colon epithelial cells. *J Dairy Sci.* 104:7415-7425. DOI:10.3168/jds.2020-19820.
- Clare DA, Swaisgood HE. 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci.* 83:1187-1195. DOI:10.3168/jds.s0022-0302(00)74983-6.
- Daliri EBM, Oh, DH, Lee BH. 2017. Bioactive peptides. *Foods.* 6(5):32. DOI:10.3990/foods6050032.
- De Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant'Ana AS. 2016. Paraprobiotics: evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci Technol.* 58:96-114. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.09.011.
- Deshpande G, Athalye-Jape G, Patole S. 2018. Para-probiotics for preterm neonates-the next frontier. *Nutrients.* 10(7):871. DOI:10.3390/nu10070871.
- Din K, Amin AM, Ahmad F, Ismail A, Shuib AS. 2022. In silico analysis of edible bird's nest protein as potential precursor for bioactive peptide. *Malays Appl Biol.* 51(2):53-62. DOI:10.55230/mabjournal.v51i2.1997.
- Do AN, Irvin MR, Lynch AI, Claas SA, Boerwinkle E, Davis BR, Ford CE, Eckfeldt JH, Tiwari HK, Limdi NA, Arnett DK. 2014. The effects of angiotensinogen gene polymorphisms on cardiovascular disease outcomes during antihypertensive treatment in GenHAT study. *Front Pharmacol.* 5:210. DOI:10.3389/f.phar/2014.00210.
- Euromonitor. 2021. Sales of yogurt and sour milk product in Indonesia.
- [FAO] Food and Agriculture Organization of The United Nation. 2002. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: FAO/WHO.
- Fisberg M, Machado R. 2015. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutr Rev.* 73(1):4-7. DOI:10.1093/nutrit/nuv020.
- FitzGerald RJ, Cermenio M, Khalesi M, Kleekayai T, Amigo-Benavent M. 2020. Application of in silico approaches for generation of milk protein-derived bioactive peptides. *J Funct.* 64:103636. DOI:10.16/j.jff.2019.103636.
- Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M, Porcari S, Rinninella E, Kaitsas F, Lener E, Mele MC, Gasbarrini A, Collado MC, *et al.* 2023. Short-chain fatty-acid-producing bacteria: key components of the human gut microbiota. *Nutrients.* 15(9):2211. DOI:10.3390/nu15092211.
- Germani A, Luneia R, Nigro F, Vitiello V, Donini LM, del Balzo V. 2014. The yogurt amino acid profile's variation during the shelf-life. *Ann Ig.* 26(3):205-212. DOI:10.7416/ai.2014.1978.
- Gonzalez-Garcia RA, McCubbin T, Navone L, Stowers C, Nielsen LK, Marcellin E. 2017. Microbial propionic acid production. *Fermentation.* 3(2):21. DOI:10.3390/fermentation2020021.
- Guo Q, Chen P, Chen X. 2023. Bioactive peptide derived from fermented foods: preparation and biological activities. *J Funct.* 101:105422. DOI:10.1016/j.jff.2023.105422.
- Gurunathan S, Thangaraj P, Kim JH. 2024. Postbiotics: functional food materials and therapeutic agents for cancer, diabetes, and inflammatory diseases. *Foods.* 13(1):89. DOI:10.3390/foods1310089.



- Hafeez Z, Cakir-Kiefer C, Roux E, Perrin C, Miclo L, Dary-Mourot A. 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Res Int.* 63:71-80. DOI:10.1016/j.foodres.2014.06.002.
- Hariyadi P. 2014. Teknologi Proses Termal untuk Industri Pangan. Bogor: Media Pangan Indonesia.
- Hernandez-Granados MJ, Franco-Robles E. 2020. Postbiotics in human health: possible new functional ingredients?. *Food Res Int.* 137:109660. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109660.
- Iwaniak A, Minkiewicz P, Pliszka M, Mogut D. 2020. Characteristics of biopeptides released in silico from collagens using quantitative parameter. *Foods.* 9(7):965. DOI:10.3390/foods9070965.
- Khaket TP, Redhu D, Dhanda S, Singh J. 2015. *In silico* evaluation of potential DPP-III inhibitor precursors form dietary proteins. *Int J Food Prop.* 18(3):499-507. DOI:10.1080/10942912.2013.787626.
- Khan IT, Nadeem M, Imran M, Ayaz M, Ajmal M, Elahi MY, Khalique A. 2017. Antioxidant capacity and fatty acids characterization of heat treated cow and buffalo milk. *Lipids Health Dis.* 16(1):163. DOI:10.1186/s12944-017-0553.z.
- Krishna TC, Najda A, Bains A, Tosif MM, Paplinski R, Kaplan M, Chawla P. 2021. Influence of ultra-heat treatment on properties of milk proteins. *Polymers.* 13(18):3164. DOI:10.3390/polym13183164.
- Korhonen H, Pihlanto A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J.* 16(9):945-950. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.10.012.
- LeBlanc JG, Chain F, Martin R, Bermudez-Humaran LG, Courau S, Langella P. 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb Cell Fact.* 16:79. DOI:10.1186/s12934-017-0691-z.
- Li C, Liu Z, Bath C, Marret L, Pryce J, Rochfort S. 2022. Optimised method for short-chain fatty acid profiling of bovine milk and serum. *Molecules.* 27(2):436. DOI:10.3390/molecules27020436.
- Manzoor M, Singh J, Gani A. 2022. Exploration of bioactive peptide from various origin as promising nutraceutical treasures: in vitro, in silico and in vivo studies. *Food Chem.* 373:131395. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131395.
- Markowiak P, Slizewska K. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 9(9):1021. DOI:10.3390/nu9091021.
- Markowiak-Kopec P, Slizewska K. 2020. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. *Nutrients.* 12(4):1107. DOI:10.3390/nu12041107.
- Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dzuva M, Darewicz M. 2008. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J AOAC Int.* 19(4):965-980. DOI:10.1093/jaoac/91.4.965.
- Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. 2019. BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. *Int J Mol Sci.* 20(23):5978. DOI:10.3390/ijms20235978.

- Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M. 2022. BIOPEP-UWM virtual-anovel database of food derived peptides with in silico-predicted biological activity. *Appl Sci*. 12(14):7204. DOI:10.3390/app12147204.
- Morrison DJ, Preston T. 2016. Formation of short chain fatty acids by gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 7(3):189-200. DOI: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- Park T, Im J, Kim AR, Lee D, Jeong S, Yun CH, Han SH. 2022. Propionate attenuates growth of oral *Streptococci* through enhancing methionine biosynthesis. *J Microbiol Biotechnol*. 32(10):1234-1244. DOI:10.4014/jmb.2205.05037.
- Peredo-Lovillo A, Hernandez-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B, Romero-Luna HE. 2022. Conventional and in silico approaches to select promising food-derived bioactive peptides: A review. *Food Chem: X*. 13:100183. DOI:10.1016/j.fochx.2021.100183.
- Rendon-Rosales MA, Torres-Llanez MJ, Mazorra-Manzano MA, Gonzalez-Cordova AF, Hernandez-Mendoza A, Vallejo-Cordoba B. 2022. In vitro and in silico evaluation of multifunctional properties of bioactive synthetic peptides identified in milk fermented with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 and NRLL B-50572. *LWT*. 154:112581. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112581.
- Rubak YT, Nuraida L, Iswantini D, Prangdimurti E. 2020. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides in milk fermented by indigenous lactic acid bacteria. *Vet World*. 13(2):345-353. DOI:10.14202/vetworld.2020.345-353.
- Saini K, Sharma S, Khan Y. 2023. DPP-4 inhibitors for treating T2DM-hype or hope? an analysis based on current literature. *Front Mol Biosci*. 10:1130625. DOI:10.3389/fmolb.2023.1130625.
- Salminen S, Collado MC, Endo A, Hill C, Lebeer S, Quigley EMM, Sanders ME, Shamir R, Swann JR, Szajewska H, Vinderola G. 2021. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 19(8):649-667. DOI: 10.1038/s41575-021-00440-6.
- Sanchez A, Vazquez A. 2017. Bioactive peptides: a review. *FQS*. 2017(1):29-46. DOI:10.1093/fqs/fyx006.
- Sitanggang AB, Sudarsono, Syah D. 2018. Pendugaan peptida bioaktif dari susu terhidrolisis oleh protease tubuh dengan teknik in silico. *J Teknol dan Industri Pangan*. 29(1):93-101. DOI:10.6066/jtip/2018/29/1/93.
- Taverniti V, Guglielmetti S. 2011. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr*. 6(3):261-274. DOI:10.1007/s12263-011-0218-x.
- Tsilingiri K, Barbosa T, Penna G, Caprioli F, Sonzogni A, Viale G, Rescigno M. 2012. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarized ex-vivo organ culture model. *Gut*. 61(7):1007-1015. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300971.
- Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. 2019. Postbiotics and definition their potential applications in early life nutrition and beyond. *Int J Mol Sci*. 20(19):4673. DOI:10.3390/ijms20194673.

- Wu X, Wang F, Chen M, Wang J, Zhang Y. 2023. Quantification of free short-chain fatty acid in raw cow milk by gas chromatography-mass spectrometry. *Foods*. 12(7):1367. DOI:10.3390/foods12071367.
- Wynn PC, Sheehy PA. 2013. Minor protein, including growth factors. Di dalam: McSweeney P, Fox P, editor. *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1A: Proteins: Basic Aspects*. Boston (MA): Springer. hlm 317 – 335.
- Zolkiewicz J, Marzec A, Ruszczyński M, Feleszko W. 2020. Postbiotics-a step beyond pre-and probiotics. *Nutrients*. 12(8):2189. DOI:10.3390/nu12082189.

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

### @Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## LAMPIRAN

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Lampiran 1 Potensi bioaktivitas peptida berdasarkan nilai A dan B

Bioaktivitas peptida	Sekuens peptida	A	B (mM <sup>-1</sup> )
<i>ACE inhibitor</i>	SPPEINTVQ	0,3333	3,83 x 10 <sup>-1</sup>
	FMAIPPKN	1,0000	5,61 x 10 <sup>-2</sup>
	AVRSPAQIL	0,4444	4,29 x 10 <sup>-3</sup>
	GEPTSTPTXE	0,6000	3,48 x 10 <sup>-1</sup>
	QDKTEIPTIN	0,4000	7,69 x 10 <sup>-4</sup>
	DASAQFIR	0,2500	2,12 x 10 <sup>-4</sup>
	AQPTDASAQFIR	0,3333	2,81 x 10 <sup>-4</sup>
	ILNKPEDETHLE	0,4167	5,43 x 10 <sup>-3</sup>
	ALPQYLK	0,5714	2,98 x 10 <sup>-3</sup>
	ALPQYLKT	0,5000	2,61 x 10 <sup>-3</sup>
	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,3871	6,18 x 10 <sup>-3</sup>
	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF	0,3243	3,63 x 10 <sup>-3</sup>
DVPSERYL	0,7500	5,20 x 10 <sup>-2</sup>	
<i>Alpha-glucosidase inhibitor</i>	SPPEINTVQ	0,2222	1,06 x 10 <sup>-5</sup>
	FMAIPPKN	0,2222	1,51 x 10 <sup>-4</sup>
	ILNKPEDETHLE	0,0833	3,33 x 10 <sup>-6</sup>
	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF	0,0700	1,22 x 10 <sup>-6</sup>
<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	SPPEINTVQ	0,7778	3,75 x 10 <sup>-5</sup>
	FMAIPPKN	0,5556	2,90 x 10 <sup>-4</sup>
	AVRSPAQIL	0,6667	1,54 x 10 <sup>-4</sup>
	GEPTSTPTXE	0,6000	4,22 x 10 <sup>-5</sup>
	QDKTEIPTIN	0,8000	2,44 x 10 <sup>-4</sup>
	DASAQFIR	0,3750	
	AQPTDASAQFIR	0,5000	
	ILNKPEDETHLE	0,5000	2,32 x 10 <sup>-3</sup>
	ALPQYLK	0,8571	1,96 x 10 <sup>-3</sup>

Lampiran 2 Potensi bioaktivitas peptida berdasarkan nilai A dan B (*lanjutan*)

Bioaktivitas peptida	Sekuens peptida	A	B (mM <sup>-1</sup> )
<i>Dipeptidyl peptidase IV inhibitor</i>	ALPQYLKT	0,8750	1,72 x 10 <sup>-3</sup>
	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,6774	7,61 x 10 <sup>-5</sup>
	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF	0,6486	1,49 x 10 <sup>-5</sup>
	DVPSERYL	0,3750	1,42 x 10 <sup>-4</sup>
<i>Renin inhibitor</i>	DASAQFIR	0,2500	1,36 x 10 <sup>-2</sup>
	AQPTDASAQFIR	0,1667	9,06 x 10 <sup>-3</sup>
<i>Alpha-amylase inhibitor</i>	FMAIPPCKN	0,1111	1,46 x 10 <sup>-4</sup>
<i>Dipeptidyl peptidase III inhibitor</i>	SPPEINTVQ	0,1111	
	FMAIPPCKN	0,1111	
	GEPTSTPTXE	0,1000	
	DASAQFIR	0,1250	
	AQPTDASAQFIR	0,0833	
	ILNKPEDETHLE	0,1667	
	ALPQYLK	0,1429	
	ALPQYLKT	0,1250	
	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0323	
	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF	0,0541	
	DVPSERYL	0,1250	
	DASAQFIR	0,1250	
	AQPTDASAQFIR	0,0833	
	ILNKPEDETHLE	0,1667	
	ALPQYLK	0,1429	
	ALPQYLKT	0,2500	
	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0968	

Lampiran 1 Potensi bioaktivitas peptida berdasarkan nilai A dan B (*lanjutan*)

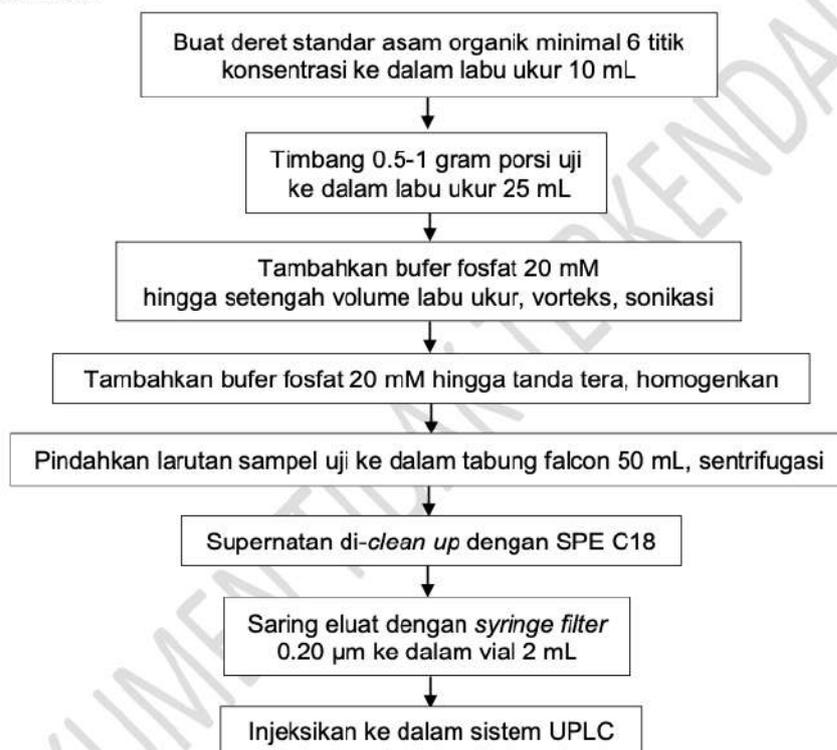
Bioaktivitas peptida	Sekuens peptida	A	B (mM <sup>-1</sup> )
<i>Antioxidative</i>	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF	0,0541	
	DVPSERYL	0,2500	
<i>CaMPDE inhibitor</i>	DASAQFIR	0,1250	
	AQPTDASAQFIR	0,0833	
<i>Neuropeptide</i>	AVRSPAQIL	0,1111	
	ILNKPEDETHLE	0,0833	
	ALPQYLK	0,1429	
	ALPQYLKT	0,1250	
	DVPSERYL	0,1250	
<i>Stimulating</i>	AVRSPAQIL	0,1111	
	ILNKPEDETHLE	0,0833	
	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0645	
	DVPSERYL	0,1250	
<i>Anti inflammatory</i>	FMAIPPCKN	0,1111	
<i>Antithrombotic</i>	FMAIPPCKN	0,3333	
<i>Bacterial permease ligand</i>	FMAIPPCKN	0,1111	
<i>Antibacterial</i>	QDKTEIPTIN	0,1000	
<i>Inhibitor of cytosol alanil aminopeptidase</i>	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0323	
<i>Lactocepin inhibitor</i>	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0323	
<i>Leucyltransferase inhibitor</i>	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0323	
<i>Xaa-pro inhibitor</i>	EETKTKVKRVIKQVRGRLMPLLKLQHAHISI	0,0323	
<i>Pancreatic lipase inhibitor</i>	KVGLKLNQKTKITASSPITSWEIDGETVETMSDFMF	0,0270	

## Lampiran 3 Prosedur Analisis SIG

<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit	No. Terbit	No. Instruksi	
		23 Juli 2021	4	18-5-32/MU	
		Tanggal Revisi	No. Revisi	Halaman	Disahkan Oleh
		-	0	1 dari 2	<i>AI</i>
<b>METODE UJI ASAM ORGANIK SECARA UPLC</b>					

**1. ACUAN**

- 1.1 Wasik, Andrzej and Buchgraber, Manuela. 2007. *Foodstuffs-Simultaneous determination of nine sweeteners by high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection*. European Commission.
- 1.2 Application Note YMC. Hybrid Silica Based C18 Column that is Stable Under the Use 100 % Aqueous Mobile Phase – YMC-Triart C18

**2. PROSEDUR****3. KONDISI PENGUKURAN INSTRUMEN**

Kolom	: <i>Reversed phase C18</i>
Fase gerak	: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM
Laju alir	: 0.425 mL/menit
Sistem pompa	: Isokratik
Volume injeksi	: 10 µL
Suhu kolom	: 37°C
Detektor	: PDA (190-400 nm), λ 210 nm

<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit 23 Juli 2021	No. Terbit 4	No. Instruksi 18-5-32/MU	
		Tanggal Revisi -	No. Revisi 0	Halaman 2 dari 2	Disahkan Oleh <i>AI</i>
<b>METODE UJI ASAM ORGANIK SECARA UPLC</b>					

#### 4. INTERPRETASI HASIL

Perhitungan kadar asam organik dalam sampel dengan menggunakan kurva kalibrasi standar dengan persamaan garis:  $Y = bx + a$ , dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar Asam Organik (ppm; mg/Kg; mg/L)} = \frac{(A_{\text{spl}} - a)}{b} \times \text{FP} \times V$$

*W<sub>spl</sub> atau V<sub>spl</sub>*

##### Keterangan:

- $A_{\text{spl}}$  = Area sampel uji
- $a$  = *Intercept* dari kurva kalibrasi standar
- $b$  = *Slope* dari kurva kalibrasi standar
- FP = Faktor pengenceran
- V = Volume akhir larutan uji (mL)
- $W_{\text{spl}}$  = Bobot penimbangan porsi uji (g)
- $V_{\text{spl}}$  = Volume pemipetan porsi uji (mL)

DOKUMEN TIDAK TERKENDALI

 <b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit 19 Januari 2022	No. Terbit 4	No. Instruksi 18-6-1/MU/SMM-SIG	
	Tanggal Revisi -	No. Revisi 0	Halaman 1 dari 6	Disahkan Oleh <i>AI</i>

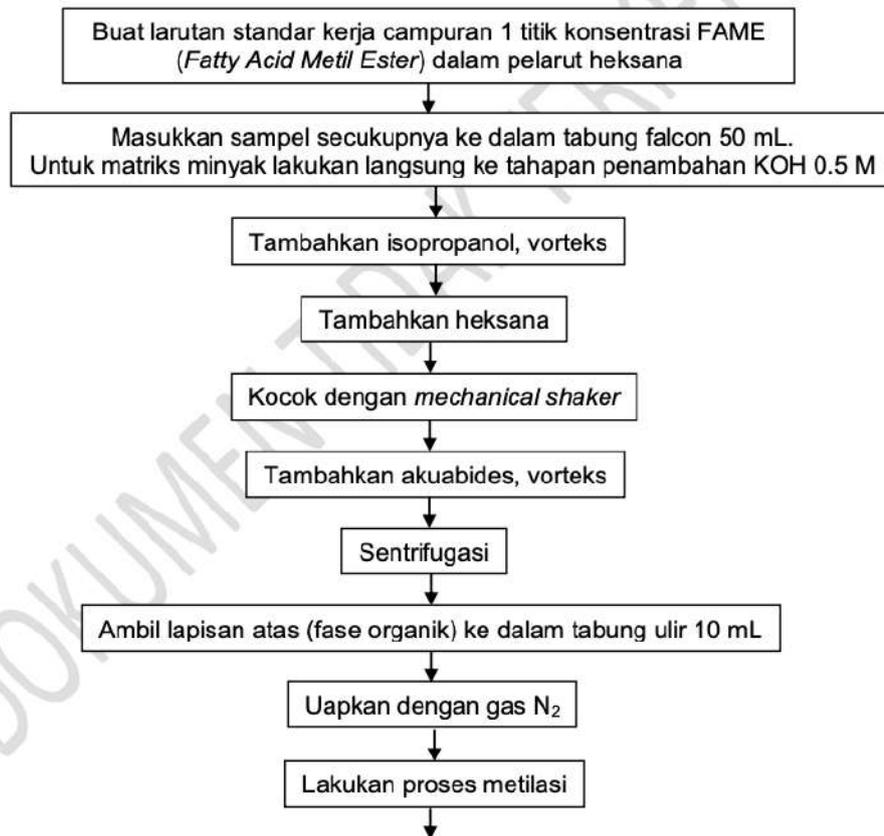
**METODE UJI  
ASAM LEMAK JENUH DAN TAK JENUH SECARA GC**

**1. ACUAN**

- 1.1 AOAC. *Analysis of Oil and Fat*, Chapter 41. page 26-28, 2000.
- 1.2 AOCS Ce 2-66. 1993. "Preparation of Methyl Esters of Long-Chain Fatty acid"
- 1.3 Ratnayake WMN, Hansen SL, Kennedy MP. 2006. Evaluation of the CP-Sil. 88 and SP-2560 GC columns used in the recent approval of AOCS Official Method Ce 1h-05: Determination of *cis*-, *trans*-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC method. *J Am Oil Chem Soc*, 83(6): 475-488.
- 1.4 SNI 01-2891-1992. *Cara uji Makanan dan Minuman*.
- 1.5 ISO 16958. 2015. "Milk, milk products, infant formula and adult nutritionals — Determination of fatty acids composition — Capillary gas chromatographic method".

**2. PROSEDUR**

**2.1 Metode BF<sub>3</sub>-Metanol**

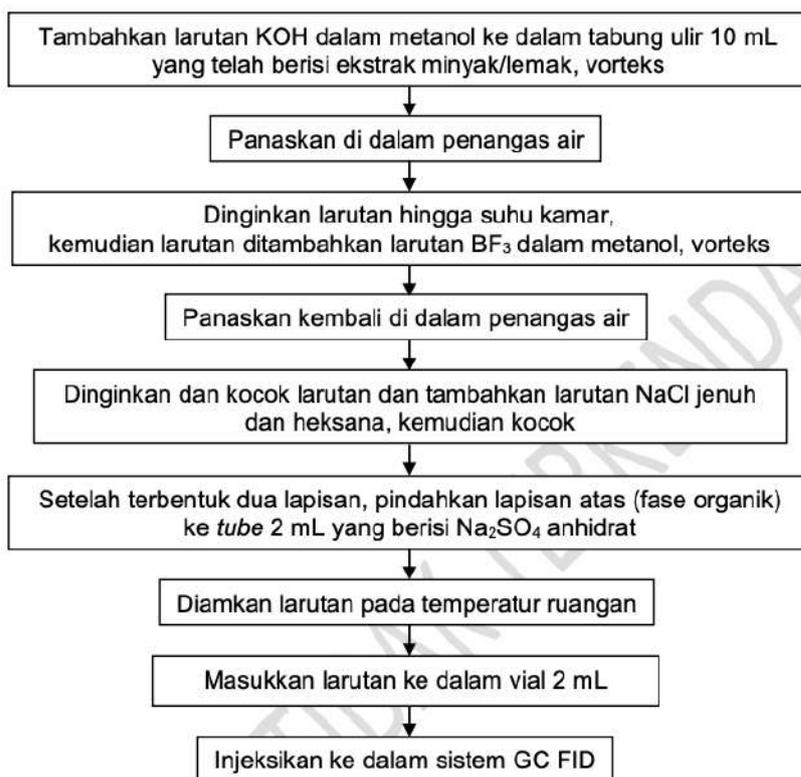


@Hak cipta milik IPB University

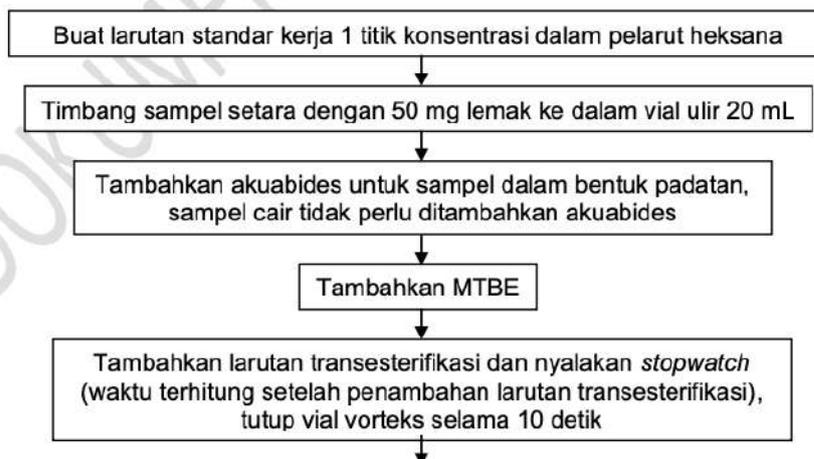
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
 1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
 2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit	No. Terbit	No. Instruksi	
		19 Januari 2022	4	18-6-1/MU/SMM-SIG	
		Tanggal Revisi	No. Revisi	Halaman	Disahkan Oleh
		-	0	2 dari 6	<i>sl</i>

**METODE UJI  
ASAM LEMAK JENUH DAN TAK JENUH SECARA GC**

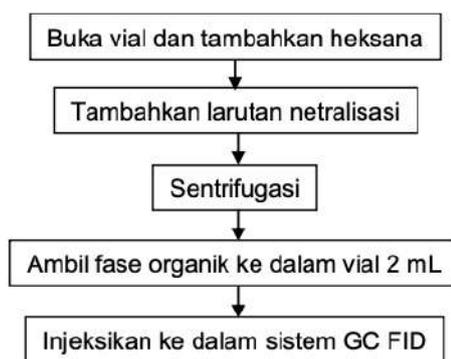


**2.2 Metode NaOCH<sub>3</sub>-Metanol**



<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit	No. Terbit	No. Instruksi	
		19 Januari 2022	4	18-6-1/MU/SMM-SIG	
		Tanggal Revisi	No. Revisi	Halaman	Disahkan Oleh
		-	0	3 dari 6	<i>AI</i>

**METODE UJI  
ASAM LEMAK JENUH DAN TAK JENUH SECARA GC**



### 3. KONDISI PENGUKURAN INSTRUMEN

#### 3.1 Kolom Supelco SP2560

##### **Inlet**

*Injection mode* : Split  
*Injection volume* : 1.0  $\mu$ L  
*Injection temperature* : 225 °C

##### **Column**

*Capillary column* : Supelco SP™ 2560  
*Carrier gas* : Nitrogen (N<sub>2</sub>)

##### **Oven**

*Oven program* : Gradien Suhu 100-240 °C

##### **Detector**

*Detector temperature* : FID  
 : 240 °C

#### 3.2 Kolom DB FastFAME

##### **Inlet**

*Injection mode* : Split  
*Injection volume* : 1.0  $\mu$ L  
*Injection temperature* : 240 °C

##### **Column**

*Capillary column* : DB FastFAME  
*Carrier gas* : Helium

##### **Oven**

*Oven program* : Gradien Suhu 50-230 °C

##### **Detector**

*Detector temperature* : FID  
 : 240 °C  
*H<sub>2</sub> flow* : 30 mL/min  
*Air flow* : 300 mL/min

<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit	No. Terbit	No. Instruksi	
		19 Januari 2022	4	18-6-1/MU/SMM-SIG	
		Tanggal Revisi	No. Revisi	Halaman	Disahkan Oleh
		-	0	4 dari 6	<i>AI</i>
<b>METODE UJI</b>					
<b>ASAM LEMAK JENUH DAN TAK JENUH SECARA GC</b>					

#### 4. INTERPRETASI HASIL

Puncak kromatogram dari hasil pengukuran sampel adalah puncak asam lemak berantai C<sub>4</sub>-C<sub>24</sub> yang diketahui dengan cara membandingkan waktu retensi setiap komponen asam lemak dari sampel dengan waktu retensi setiap komponen asam lemak dari standar:

##### 4.1 Asam Lemak dalam Injeksi

Perhitungan kadar setiap komponen asam lemak dalam injeksi dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar as. lemak injeksi (\%)} = \frac{\text{Luas area komponen as. lemak}}{\text{Total luas area komponen as. lemak}} \times 100 \%$$

##### 4.2 Asam Lemak dalam Sampel

Perhitungan kadar setiap komponen asam lemak dalam sampel dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar as. lemak (\%)} = \text{Kadar as. lemak injeksi (\%)} \times \text{Kadar lemak (\%)}$$

##### 4.3 Asam Lemak Jenuh dalam Sampel

Perhitungan asam lemak jenuh dilakukan dengan menjumlahkan setiap komponen asam lemak jenuh, dimana komponen asam lemak jenuh dapat dilihat pada Tabel 1.

$$\text{Kadar as. lemak jenuh (\%)} = \sum \text{Kadar as. lemak jenuh injeksi (\%)} \times \text{Kadar lemak (\%)}$$

##### 4.4 Asam Lemak Tak Jenuh dalam Sampel

Perhitungan kadar asam lemak tak jenuh dihitung dengan menjumlahkan setiap komponen asam lemak tak jenuh, dimana komponen asam lemak tak jenuh dapat dilihat pada Tabel 1.

$$\text{Kadar as. lemak tak jenuh (\%)} = \sum \text{Kadar as. lemak tak jenuh injeksi (\%)} \times \text{Kadar lemak (\%)}$$

##### 4.5 Asam Lemak Tak Jenuh Tunggal dalam Sampel (Mono Unsaturated Fatty Acid / MUFA)

Perhitungan kadar asam lemak tak jenuh tunggal dihitung dengan menjumlahkan setiap komponen asam lemak tak jenuh tunggal, dimana komponen asam lemak tak jenuh tunggal dapat dilihat pada Tabel 1.

$$\text{Kadar MUFA (\%)} = \sum \text{Kadar MUFA injeksi (\%)} \times \text{Kadar lemak (\%)}$$

##### 4.6 Asam Lemak Tak Jenuh Ganda dalam Sampel (Poly Unsaturated Fatty Acid / PUFA)

Perhitungan kadar asam lemak tak jenuh ganda dihitung dengan menjumlahkan setiap komponen asam lemak tak jenuh ganda, dimana komponen asam lemak tak jenuh ganda dapat dilihat pada Tabel 1.

$$\text{Kadar PUFA (\%)} = \sum \text{Kadar PUFA injeksi (\%)} \times \text{Kadar lemak (\%)}$$

<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit 19 Januari 2022	No. Terbit 4	No. Instruksi 18-6-1/MU/SMM-SIG	
		Tanggal Revisi -	No. Revisi 0	Halaman 5 dari 6	Disahkan Oleh <i>AI</i>
<b>METODE UJI ASAM LEMAK JENUH DAN TAK JENUH SECARA GC</b>					

#### 4.7 Total Asam Lemak dalam Sampel

Perhitungan kadar total asam lemak dalam sampel dihitung dengan menjumlahkan kadar asam lemak jenuh dan kadar asam lemak tak jenuh dapat menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar total as. lemak (\%)} = \text{Kadar as. lemak jenuh (\%)} + \text{Kadar as. lemak tak jenuh (\%)}$$

Tabel 1 Daftar Analit Asam Lemak

No	Komponen	Nama Lain
<b>A. Asam Lemak Jenuh (SFA)</b>		
1	C4:0	Asam butirat
2	C6:0	Asam kaproat
3	C8:0	Asam kaprilat
4	C10:0	Asam kaprat
5	C11:0	Asam undekanoat
6	C12:0	Asam laurat
7	C13:0	Asam tridekanoat
8	C14:0	Asam miristat
9	C15:0	Asam pentadekanoat
10	C16:0	Asam palmitat
11	C17:0	Asam heptadekanoat
12	C18:0	Asam stearat
13	C20:0	Asam Arachidat
14	C21:0	Asam heneikosanoat
15	C22:0	Asam behenat
16	C23:0	Asam trikosanoat
17	C24:0	Asam lignokerat
<b>B Asam Lemak Tak Jenuh Tunggal (MUFA)</b>		
1	C14:1	Asam miristoleat
2	C15:1	Asam pentadekenoat
3	C16:1	Asam palmitoleat
4	C17:1	Asam heptadekenoat
5	C18:1 $\omega$ 9t	Asam oleat/ $\omega$ 9t
6	C18:1 $\omega$ 9c	Asam oleat/ $\omega$ 9c
7	C20:1	Asam eikosenoat
8	C22:1 $\omega$ 9	Asam erukat
9	C24:1	Asam nervonat
<b>C Asam Lemak Tak Jenuh Ganda (PUFA)</b>		
1	C18:2 $\omega$ 6t	Asam linoleat/ $\omega$ 6t
2	C18:2 $\omega$ 6c	Asam linoleat/ $\omega$ 6c
3	C18:3 $\omega$ 6	$\gamma$ -asam linolenat/ $\omega$ 3
4	C18:3 $\omega$ 3	$\alpha$ -Asam linolenat/ $\omega$ 3
5	C20:2	Asam eikosadienoat
6	C20:3 $\omega$ 6	Asam eikosatrienoat

<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit	No. Terbit	No. Instruksi	
		19 Januari 2022	4	18-6-1/MU/SMM-SIG	
		Tanggal Revisi	No. Revisi	Halaman	Disahkan Oleh
		-	0	6 dari 6	<i>al</i>
<b>METODE UJI ASAM LEMAK JENUH DAN TAK JENUH SECARA GC</b>					

No	Komponen	Nama Lain
<b>C</b>	<b>Asam Lemak Tak Jenuh Ganda (PUFA)</b>	
7	C20:3 $\omega$ 3	Asam eikosatrinoat
8	C20:4 $\omega$ 6	Asam arachidonat / AA
9	C22:2	Asam dokosadienoat
10	C20:5 $\omega$ 3	Asam eikosapentaenoat / EPA
11	C22:6 $\omega$ 3	Asam dokosaheksaenoat / DHA

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DOKUMEN TIDAK TERKENDALI

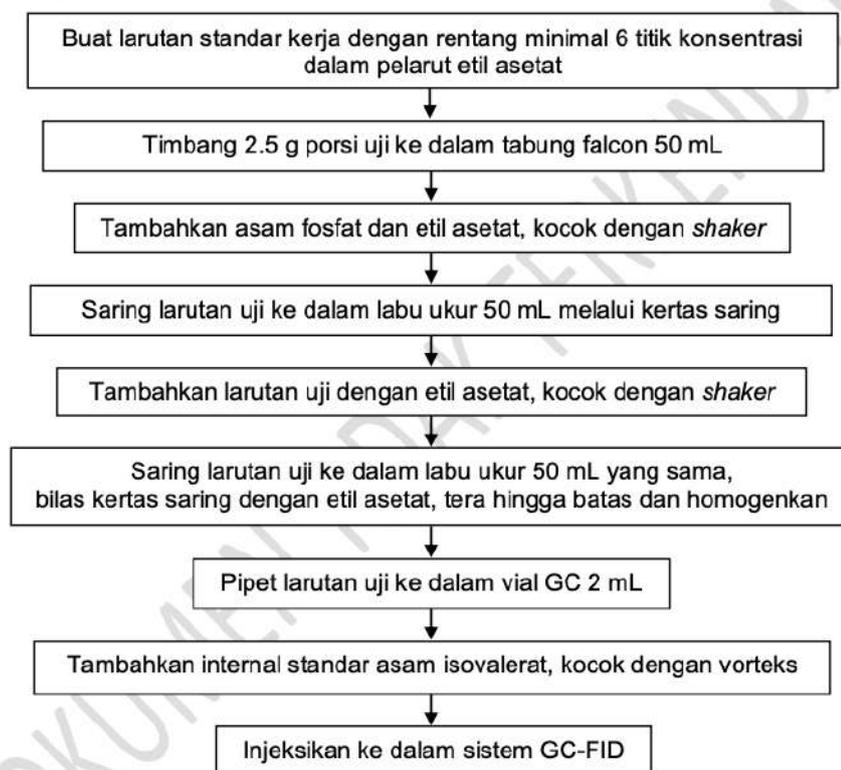
<b>SIG</b>	<b>DIAGRAM ALIR (UNTUK EKSTERNAL)</b>	Tanggal Terbit 22 Maret 2021	No. Terbit 4	No. Instruksi 18-6-11/MU/SMM-SIG	
		Tanggal Revisi -	No. Revisi 0	Halaman 1 dari 2	Disahkan Oleh <i>AI</i>

**METODE UJI  
UJI ASAM PROPIONAT SECARA GC**

**1. ACUAN**

- 1.1 M. J. Scotter , S. A. Thorpe , S. L. Reynolds , L. A. Wilson & P. R. Strutt. 1994. *A rapid cappillary gas chromatographic method for the determination of propionic acid and propionates in bread and bread products*, Food Additives & Contaminants, 11:3, 295-300.
- 1.2 KAN K-01.03 Persyaratan Tambahan Akreditasi Laboratorium Pengujian Kimia Pangan.

**2. PROSEDUR**



**3. KONDISI PENGUKURAN INSTRUMEN**

**Metode GC –FID**

**Inlet**

*Injection mode* = Split  
*Injection temperature* = 220°C

**Kolom**

*Capillary column* = DB-Wax  
*Carrier gas* = Nitrogen

## Lampiran 4 Hasil Analisis Proksimat

**PT.INDOLAKTO****Indofood CBP****INDOLAKTO CENTRAL LABORATORY**

Indolacto Laboratory have been accredited by KAN (No. LP-1474-IDN) in compliance with ISO/IEC 17025:2017

F.CIL.QM.C.008A

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**Laporan Hasil Analisa **KIMIA****Number / Nomor** : 126/IDL-1/XII/2023

Page 1 of 2

**Principal / Pelanggan**

- **Name / Nama** : CRD - PT Indolacto Jakarta  
 - **Address / Alamat** : Jl. Raya Bogor KM 26,6 Jakarta Timur 13710  
 - **Contact Person / Personel Penghubung** : Milka Sulistiawati

**Date of Received / Tanggal Penerimaan** : 01 Dec 2023

**Date of Issued / Tanggal Penerbitan** : 13 Dec 2023

**Date of Analysis / Tanggal Analisa** : 01 Dec 2023 - 12 Dec 2023

**Order No. / No. Order** : 230087

Sample Name Nama Sample	Parameter Parameter	Method Metode	Unit Satuan	Result Nilai
494_Yogurt Pouch 1A_1	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	25.66
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.90
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.88
	Karbohidrat	By Difference	%	18.01
495_Yogurt Pouch 1A_2	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	25.42
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.90
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.99
	Karbohidrat	By Difference	%	17.65
496_Yogurt Pouch 1B_1	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	25.23
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.90
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.85
	Karbohidrat	By Difference	%	17.62
497_Yogurt Pouch 1B_2	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	25.23
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	3.10

**Catatan / Note :**

1. Terakreditasi oleh KAN (No. LP-1474-IDN) sesuai dengan ISO/IEC 17025.  
 Accredited by KAN (No. LP-1474-IDN) in compliance with ISO/IEC 17025.

2. Hasil analisa berdasarkan contoh yang diterima oleh Central Laboratory PT Indolacto.  
 All analytical results that issued are based on the received sample by Central Laboratory PT Indolacto.

3. Dilarang mengutip, memperbanyak, dan / atau mempublikasikan isi Laporan ini tanpa ijin dari Central Laboratory PT Indolacto.  
 It is prohibited to copy, reproduce, and / or publish the content of this Certificate without Central Laboratory approval.

**Laboratory Technical Responsible  
 / Penanggung Jawab Teknis**

KIMIA



(Pratiwi Mustika)

Factory - Jakarta  
 Jl. Raya Bogor Km. 26,6 Jakarta 13710  
 PO. Box 2531 Jakarta 10001  
 Indonesia

Telex: 48255 INDOMK IA  
 T. +6221 871 0211  
 F. +6221 871 0404  
 www.indofood.co.id

a subsidiary of:

**Indofood**  
 THE SYMBOL OF QUALITY FOODS

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

@ Hak cipta milik IPB University

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Laporan Hasil Analisa **KIMIA**

Number / Nomor : 126/IDL-1/XII/2023

Page 2 of 2

Sample Name Nama Sample	Parameter Parameter	Method Metode	Unit Satuan	Result Nilai
497_Yogurt Pouch 1B_2	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.84
	Karbohidrat	By Difference	%	17.43
498_Yogurt Pouch 2A_1	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	23.50
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.80
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	4.06
	Karbohidrat	By Difference	%	16.07
499_Yogurt Pouch 2A_2	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	23.62
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.20
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.86
	Karbohidrat	By Difference	%	16.79
500_Yogurt Pouch 2B_1	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	23.52
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.80
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.69
	Karbohidrat	By Difference	%	16.28
501_Yogurt Pouch 2B_2	Total Solid (SKM)*	AS 2300.1.1-2008	%	23.45
	Lemak (SKM)*	WI.CIL.QM.A.P.008 (Gerber Neusal)	%	2.57
	Protein*	AOAC 920.115-2005	%	3.65
	Karbohidrat	By Difference	%	16.50

Note: (\*) merupakan parameter Ruang Lingkup ISO 17025 ver. 2017

Catatan / Note :

1. Terakreditasi oleh KAN (No. LP-1474-IDN) sesuai dengan ISO/IEC 17025.  
*Accredited by KAN (No. LP-1474-IDN) in compliance with ISO/IEC 17025.*
2. Hasil analisa berdasarkan contoh yang diterima oleh Central Laboratory PT Indolacto.  
*All analytical results that issued are based on the received sample by Central Laboratory PT Indolacto.*
3. Dilarang mengutip, memperbanyak, dan / atau mempublikasikan isi Laporan ini tanpa ijin dari Central Laboratory PT Indolacto.  
*It is prohibited to copy, reproduce, and / or publish the content of this Certificate without Central Laboratory approval.*

Laboratory Technical Responsible  
/ Penanggung Jawab Teknis

KIMIA



( Pratiwi Mustika )

Factory - Jakarta  
Jl. Raya Bogor Km. 26,6 Jakarta 13710  
P.O. Box 2531 Jakarta 10001  
Indonesia

Telex. 48255 INDOMK IA  
T. +6221 871 0211  
F. +6221 871 0404  
www.indofood.co.id

a subsidiary of:

**Indofood**  
THE STANDARDS OF QUALITY FOODS



Lampiran 5 Hasil Analisis SCFA



28.1/F-PP Revisi 4

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RESULT OF ANALYSIS / LAPORAN HASIL UJI

<b>I. Number / Nomor</b>	
1.1. Order No. / No. Order	: SIG.MARK.F.XI.2023.036910
1.2. Certificate No. / No. sertifikat	: SIG.LHP.XI.2023.280918452
<b>II. Principal / Pelanggan</b>	
2.1. Name / Nama	: PT. Indolakto
2.2. Address / Alamat	: Jl. Raya Siliwangi, Cicurug - Sukabumi 43359
2.3. Phone / Telepon	: +6285717130501
2.4. Contact Person / Personil Penghubung	: Milka Sulistiawati
<b>III. Sample / Contoh Uji</b>	
3.1. Sample Code / Kode Sampel	: -
3.2. Batch Number / No Batch	: -
3.3. Lot Number / No Lot	: -
3.4. Packaging / Kemasan	: -
3.5. Production Date / Tanggal Produksi	: -
3.6. Expire Date / Tanggal Kadaluaarsa	: -
3.7. Factory Name / Nama Pabrik	: -
3.8. Factory Address / Alamat Pabrik	: -
3.9. Trade Mark / Nama Dagang	: -
3.10. Sample Name / Nama Sample	: 1B
3.11. Other Information / Keterangan Lain	: -
3.12. Date of Sampling / Tanggal Sampling	: -
3.13. Sampling Location / Lokasi Sampling	: -
3.14. Method Sampling / Metode Sampling	: -
3.15. Personnel Sampling / Personil Sampling	: -
3.16. Environmental Conditions / Kondisi Lingkungan	: -
3.17. Date of Acceptance / Diterima	: 16 November 2023
3.18. Date of Analysis / Tanggal Uji	: 16 November 2023 - 27 November 2023
3.19. Type of Analysis / Jenis Uji	: Terlampir
<b>IV. Result / Hasil Uji</b>	

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
www.siglaboratory.com

Result Of Analysis | Page 1 of 2  
The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
This report shall not be reproduced except in full context,  
without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

No	Parameter	Unit	Simplo	Duplo	Limit Of Detection	Method
1	Asam Asetat	mg / kg	34066.29	33561.18	-	18-5-32/MU (UPLC-PDA)
2	Asam Propionat	mg / kg	Not detected	Not detected	3.67	18-6-11/MU/SMM-SIG (GC-FID)
3	C 4:0 (Asam Butirat)	%	0.05	0.05	-	18-6-1/MU/SMM-SIG (GC-FID)

Bogor, 28 November 2023  
PT. Saraswanti Indo Genetech



**Dwi Yulianto Laksono, S.Si**  
General Laboratory Manager



#### Result Of Analysis | Page 2 of 2

The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
This report shall not be reproduced except in full context,  
without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
www.siglaboratory.com

### RESULT OF ANALYSIS / LAPORAN HASIL UJI

- I. Number / Nomor**
- 1.1. Order No. / No. Order : SIG.MARK.F.XI.2023.036910  
 1.2. Certificate No. / No. sertifikat : SIG.LHP.XII.2023.121037532
- II. Principal / Pelanggan**
- 2.1. Name / Nama : PT. Indolacto  
 2.2. Address / Alamat : Jl. Raya Siliwangi, Cicurug - Sukabumi 43359  
 2.3. Phone / Telepon : +6285717130501  
 2.4. Contact Person / Personil Penghubung : Milka Sulistiawati
- III. Sample / Contoh Uji**
- 3.1. Sample Code / Kode Sampel : -  
 3.2. Batch Number / No Batch : -  
 3.3. Lot Number / No Lot : -  
 3.4. Packaging / Kemasan : -  
 3.5. Production Date / Tanggal Produksi : -  
 3.6. Expire Date / Tanggal Kadaluausa : -  
 3.7. Factory Name / Nama Pabrik : -  
 3.8. Factory Address / Alamat Pabrik : -  
 3.9. Trade Mark / Nama Dagang : -  
 3.10. Sample Name / Nama Sample : 2B  
 3.11. Other Information / Keterangan Lain : -  
 3.12. Date of Sampling / Tanggal Sampling : -  
 3.13. Sampling Location / Lokasi Sampling : -  
 3.14. Method Sampling / Metode Sampling : -  
 3.15. Personnel Sampling / Personil Sampling : -  
 3.16. Environmental Conditions / Kondisi Lingkungan : -  
 3.17. Date of Acceptance / Diterima : 16 November 2023  
 3.18. Date of Analysis / Tanggal Uji : 16 November 2023 - 07 Desember 2023  
 3.19. Type of Analysis / Jenis Uji : Terlampir
- IV. Result / Hasil Uji**

No	Parameter	Unit	Simplo	Duplo	Limit Of Detection	Method
1	Asam Asetat	mg / kg	33726.63	33612.97	-	18-5-32/MU (UPLC-PDA)
2	Asam Propionat	mg / kg	Not detected	Not detected	3.67	18-6-11/MU/SMM-SIG (GC-FID)
3	C 4:D (Asam Butirat)	%	0.06	0.06	-	18-6-1/MU/SMM-SIG (GC-FID)

Bogor, 12 Desember 2023  
PT. Saraswanti Indo Genetech



**Dwi Yulianto Laksono, S.Si**  
General Laboratory Manager

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
www.siglaboratory.com

**Result Of Analysis | Page 2 of 2**  
The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
This report shall not be reproduced except in full context,  
without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech



### RESULT OF ANALYSIS / LAPORAN HASIL UJI

<b>I. Number / Nomor</b>	
1.1. Order No. / No. Order	: SIG.MARK.F.XI.2023.036910
1.2. Certificate No. / No. sertifikat	: SIG.LHP.XI.2023.280918451
<b>II. Principal / Pelanggan</b>	
2.1. Name / Nama	: PT. Indolakto
2.2. Address / Alamat	: Jl. Raya Siliwangi, Cicurug - Sukabumi 43359
2.3. Phone / Telepon	: +6285717130501
2.4. Contact Person / Personil Penghubung	: Milka Sulistiawati
<b>III. Sample / Contoh Uji</b>	
3.1. Sample Code / Kode Sampel	: -
3.2. Batch Number / No Batch	: -
3.3. Lot Number / No Lot	: -
3.4. Packaging / Kemasan	: -
3.5. Production Date / Tanggal Produksi	: -
3.6. Expire Date / Tanggal Kadaluaarsa	: -
3.7. Factory Name / Nama Pabrik	: -
3.8. Factory Address / Alamat Pabrik	: -
3.9. Trade Mark / Nama Dagang	: -
3.10. Sample Name / Nama Sample	: 1A
3.11. Other Information / Keterangan Lain	: -
3.12. Date of Sampling / Tanggal Sampling	: -
3.13. Sampling Location / Lokasi Sampling	: -
3.14. Method Sampling / Metode Sampling	: -
3.15. Personnel Sampling / Personil Sampling	: -
3.16. Environmental Conditions / Kondisi Lingkungan	: -
3.17. Date of Acceptance / Diterima	: 16 November 2023
3.18. Date of Analysis / Tanggal Uji	: 16 November 2023 - 27 November 2023
3.19. Type of Analysis / Jenis Uji	: Terlampir
<b>IV. Result / Hasil Uji</b>	

#### Result Of Analysis | Page 1 of 2

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
 Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
 Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
 www.siglaboratory.com

The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
 This report shall not be reproduced except in full context,  
 without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

No	Parameter	Unit	Simplo	Duplo	Limit Of Detection	Method
1	Asam Asetat	mg / kg	34617.09	34512.40	-	18-5-32/MU (UPLC-PDA)
2	Asam Propionat	mg / kg	Not detected	Not detected	3.67	18-6-11/MU/SMM-SIG (GC-FID)
3	C 4:0 (Asam Butirat)	%	0.06	0.06	-	18-6-1/MU/SMM-SIG (GC-FID)

Bogor, 28 November 2023  
PT. Saraswanti Indo Genetech



**Dwi Yulianto Laksono, S.Si**  
General Laboratory Manager

#### Result Of Analysis | Page 2 of 2

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
www.siglaboratory.com

The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
This report shall not be reproduced except in full context,  
without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

### RESULT OF ANALYSIS / LAPORAN HASIL UJI

<b>I. Number / Nomor</b>	
1.1. Order No. / No. Order	: SIG.MARK.F.XI.2023.036910
1.2. Certificate No. / No. sertifikat	: SIG.LHP.XII.2023.121037531
<b>II. Principal / Pelanggan</b>	
2.1. Name / Nama	: PT. Indolakto
2.2. Address / Alamat	: Jl. Raya Siliwangi, Cicurug - Sukabumi 43359
2.3. Phone / Telepon	: +6285717130501
2.4. Contact Person / Personil Penghubung	: Milka Sulistiawati
<b>III. Sample / Contoh Uji</b>	
3.1. Sample Code / Kode Sampel	: -
3.2. Batch Number / No Batch	: -
3.3. Lot Number / No Lot	: -
3.4. Packaging / Kemasan	: -
3.5. Production Date / Tanggal Produksi	: -
3.6. Expire Date / Tanggal Kadaluarsa	: -
3.7. Factory Name / Nama Pabrik	: -
3.8. Factory Address / Alamat Pabrik	: -
3.9. Trade Mark / Nama Dagang	: -
3.10. Sample Name / Nama Sample	: 2A
3.11. Other Information / Keterangan Lain	: -
3.12. Date of Sampling / Tanggal Sampling	: -
3.13. Sampling Location / Lokasi Sampling	: -
3.14. Method Sampling / Metode Sampling	: -
3.15. Personnel Sampling / Personil Sampling	: -
3.16. Environmental Conditions / Kondisi Lingkungan	: -
3.17. Date of Acceptance / Diterima	: 16 November 2023
3.18. Date of Analysis / Tanggal Uji	: 16 November 2023 - 07 Desember 2023
3.19. Type of Analysis / Jenis Uji	: Terlampir
<b>IV. Result / Hasil Uji</b>	

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
 Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
 Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
 www.siglaboratory.com

**Result Of Analysis | Page 1 of 2**  
 The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
 This report shall not be reproduced except in full context,  
 without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

No	Parameter	Unit	Simplo	Duplo	Limit Of Detection	Method
1	Asam Asetat	mg / kg	33946.82	33879.64	-	18-5-32/MU (UPLC-PDA)
2	Asam Propionat	mg / kg	Not detected	Not detected	3.67	18-6-11/MU/SMM-SIG (GC-FID)
3	C 4:0 (Asam Butirat)	%	0.07	0.07	-	18-6-1/MU/SMM-SIG (GC-FID)

Bogor, 12 Desember 2023  
PT. Saraswanti Indo Genetech



**Dwi Yulianto Laksono, S.Si**  
General Laboratory Manager

PT SARASWANTI INDO GENETECH  
Graha SIG Jl. Rasamala No. 20 Taman Yasmin Bogor 16113  
Tel. +62 251 7532 348 Hotline. +62 821 11 516 516  
www.siglaboratory.com

**Result Of Analysis | Page 2 of 2**  
The results of these tests relate only to the sample(s) submitted.  
This report shall not be reproduced except in full context,  
without the written approval of PT. Saraswanti Indo Genetech

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

## RIWAYAT HIDUP



@Hak cipta milik IPR University

Penulis dilahirkan di kota Banyumas pada 1 Maret 1982 sebagai anak pertama dari dua bersaudara pasangan Bapak Joewono Elijanto dan Ibu Sulistyani Siswadi. Pendidikan sarjana ditempuh di Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Diponegoro Semarang, dan lulus pada tahun 2003.

Penulis memulai karir sebagai QC Unit Head di PT Avesta Continental Pack, dan kemudian melanjutkan karirnya sebagai Packaging Development Manager di PT. Frisian Flag Indonesia. Penulis kemudian melanjutkan karirnya sebagai Sr. R&D Manager di PT Danone Dairy Indonesia. Saat ini bekerja sebagai Technical Research Manager di PT Indolakto sejak tahun 2013.

Penulis diterima sebagai mahasiswa program magister (S-2) di Program Studi Magister Teknologi Pangan pada Sekolah Pascasarjana IPB pada tahun 2022. Sebagai tugas akhir, penulis melakukan penelitian mengenai efek proses pemanasan pada karakteristik produk yogurt di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Nurheni Sri Palupi, M.Si. dan Prof. Dr. Ir. Lilis Nuraida, M.Sc. Karya Ilmiah dengan judul “Characterization of Lactic Acid Bacteria Postbiotic: Bioactive Peptide on Yogurt with Thermal Inactivation Process”, saat ini sudah dalam proses *accepted* untuk publikasi oleh the Annals of the University Dunarea de Jos - Food Technology.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.