

LAPORAN PENELITIAN



**Inovasi Pengembangan Produk Halal Berbasis Budaya Lokal
Ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan Sebagai Terapi Suportif
dalam Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Kardiovaskuler**

**Peneliti Utama : DR. dr. Ermin Rachmawati, M. Biomed
Larasati Sekar Kinasih, M.Gz**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**

TAHUN ANGGARAN 2022

rINGKASAN

Disfungsi endotel dan aterosklerosis akibat tingginya stress oksidatif dan inflamasi merupakan proses patologis yang mendasari penyakit jantung coroner (PJK) sebagai peringkat pertama penyebab kematian di seluruh dunia akibat Penyakit Tidak Menular (PTM) (1,2). Kepatuhan masyarakat resiko tinggi untuk konsumsi agen farmakologis aspirin dan statin serta komitmen untuk melakukan gaya hidup sehat masih rendah menjadikan upaya pencegahan penyakit kardiovaskuler masih menyisakan masalah. Fakta lainnya bahwa penggunaan jangka panjang obat-obatan golongan statin terbukti memiliki beberapa efek samping serius diantaranya adalah rhabdomyolisis, miopati, dan ulkus peptikum. Oleh karena itu diperlukan inovasi pengembangan terapi suportif patologi dari PJK yang aman dikonsumsi untuk jangka panjang berupa terapi berbasis pangan fungsional.

Lalapan (kubis, timun, kemangi) dan sambal dengan komposisi bawang merah, bawang putih, tomat, cabe rawit merupakan salah satu menu khas Indonesia yang merupakan bagian budaya lokal dan terbukti dapat memperbaiki profil lipid, menurunkan inflamasi dan stress oksidatif karena kandungan antioksidannya. Namun sayangnya, teknik pengolahan sambal seperti penggorengan suhu tinggi dalam waktu lama menyebabkan manfaat senyawa fitokimia dari bahan alam hilang ditambah dengan peningkatan kadar lemak jenuh akibat proses penggorengan. Maka dari itu, perlu adanya modifikasi pengolahan sambal lalapan yaitu fermentasi. Proses fermentasi secara umum dapat meningkatkan kandungan gizi dan meningkatkan masa simpan yang disebabkan metabolit sekunder hasil sekresi bakteri asam laktat. Isu halal menjadi penting dalam pengembangan produk baru. Namun kajian kritis mengenai titik kritis halal pada produk fermentasi masih sangat terbatas. Berkaitan dengan penelitian hilirisasi produk, aspek keamanan makanan dan pencegahan munculnya pathogen makanan perlu dilakukan yang juga menjadi landasan penting dari studi kali ini.

Penelitian ini berorientasi kepada penemuan suatu model atau postulat baru yang mendukung suatu proses teknologi, kesehatan, pertanian, dalam rangka mendukung penelitian terapan untuk penemuan terapi suportif berupa pangan fungsional halal dalam tatalaksana pencegahan maupun bagian pengobatan suportif penyakit kardiovaskuler. Tujuan penelitian ini adalah untuk Mengetahui profil mikroba, karakteristik fisikokimia, penerimaan produk makanan, kandungan senyawa aktif, dari Fermentasi Sambal Lalapan (FSL); penetapan titik kritis halal proses Fermentasi Sambal Lalapan; aktivitas antioksidan, prediksi target kerja EFSL melalui studi insilico, mekanisme kerja EFSL dengan uji in vitro dan in vivo yang berhubungan dengan inhibisi aterosklerosis sebagai etiologi PJK.

Penelitian ini merupakan kombinasi penelitian deskriptif untuk melihat profil metabolit sekunder dan bakteri asam laktat fermentasi sambal lalapan, in silico dan penelitian eksperimen murni dengan desain in vitro dan in vivo. Penelitian in silico terdiri dari penelitian deskriptif dan docking molekuler menggunakan kelompok control. Penelitian deskriptif in silico bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisikokimia, ADME, druglikeness, prediksi aktivitas biologis dari senyawa aktif pada

fermentasi sambal lalapan. Penelitian *in silico docking* molekuler menggunakan model spesifik *docking* menggunakan kontrol statin. Penelitian eksperimen dalam rangka optimasi metode fermentasi sambal lalapan menggunakan 4 perlakuan (K, P1, P2, P3, P4).

Penelitian untuk menentukan gambaran profil mikroba, metabolit sekunder dari fermentasi sambal lalapan, uji *in silico* merupakan penelitian deskriptif dimana data disajikan secara kualitatif (gambar) dan kuantitatif. Rangkaian proses tersebut dilakukan di UM. Profil mikroba terbanyak kemudian dilakukan sistematik review untuk melihat potensinya dalam menghambat PJK. Masih di UM, penelitian terkait aspek halal produk fermentasi akan dilakukan review sistematik terkait penetapan titik kritis halal dan juga uji observasional mengenai pengetahuan pelaku usaha industry kecil yang bergerak di bidang fermentasi terkait alur penetapan produk halal.

Penelitian eksperimen uji antioksidan dan *in vitro* yang direncanakan dikerjakan di Unair, menggunakan desain *post-test only* dengan kontrol. Kontrol adalah sel dengan pemberian medium lengkap, sementara 8 Perlakuan dibedakan berdasarkan pemberian EFSL dosis 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560 µg/ml inkubasi selama 24 jam. Penelitian eksperimen *in vitro* sampel dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok sel normal tanpa perlakuan apapun, kelompok kontrol negatif (K-) adalah kelompok sampel makrofag Raw264.7 yang dipapar oxLDL. Kelompok ketiga adalah kelompok kontrol positif (K+) adalah kelompok sampel yang tidak hanya diperlakukan sesuai model aterosklerosis namun juga dipapar dengan statin. Kelompok 4, 5, 6 adalah kelompok sampel yang dipapar dengan oxLDL/LPS pada *in vitro* ditambah dengan pemberian ekstrak fermentasi sambal lalapan (EFSL) dosis 1, 2, 3.

Penelitian eksperimen *in vivo* merupakan bagian dari UB, dimana sampel dibagi dalam 6 kelompok, yaitu kelompok kelinci normal tanpa perlakuan apapun, kelompok kontrol negatif (K-) adalah kelompok sampel dengan perlakuan pemberian model aterosklerosis kelinci dengan diet tinggi lemak. Kelompok ketiga adalah kelompok kontrol positif (K+) adalah kelompok sampel yang tidak hanya diperlakukan sesuai model aterosklerosis namun juga dipapar dengan statin. Kelompok 4, 5, 6 adalah kelompok sampel yang dipapar dengan diet tinggi lemak pada kelinci ditambah dengan pemberian EFSL dosis 1, 2, 3.

pH merupakan indikator derajat maturasi dari fermentasi sayur. Semakin asam produk fermentasi makanan mudah disterilkan. Disebutkan dalam suatu penelitian, bahwa keberhasilan fermentasi ditentukan jika mendapat nilai pH 3,6. Penelitian lainnya menyebutkan bahwa pH terbaik untuk pematangan fermentasi sayur adalah 4,2-4,4. Pada penelitian ini kisaran pH 3,6-4 didapat pada kelompok fermentasi sambal lalapan 14 dan 21 hari.

Nilai rata – rata kesukaan panelis pada atribut rasa berkisar 4.30 – 2.67 yang artinya panelis cenderung biasa sampai agak suka. Tingkat kesukaan rasa produk kontrol berbeda nyata dengan semua perlakuan produk fermentasi. Tingkat kesukaan rasa produk dengan fermentasi 7 hari lebih tinggi secara nyata dibandingkan dengan tingkat kesukaan produk fermentasi 12 hari. Profil Mikrobiologi Fermentasi Sambal Lalapan Menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS) menunjukkan perbandingan jumlah bakteri yang cukup nyata berdasarkan data secara deskripsi. Sampel perlakuan fermentasi terlihat terdapat berbagai bakteri mulai dari filum sampai dengan spesies.

Produk fermentasi sambal lalapan mengandung bakteri asam laktat berdasarkan hasil morfologi dan biokimia Bakteri Asam Laktat yang dilakukan. Hasil pewarnaan gram didapatkan warna ungu yang menandakan bakteri gram positif. Uji endospore didapatkan warna merah muda yang menandakan kemampuan dalam membentuk spora sebagai ciri BAL. Uji hemolisis untuk deteksi kuman patogen menggunakan blood agar tidak ditemukan zona bening sehingga dapat disimpulkan FSL tidak mengandung bakteri patogen. Isolat tunggal BAL kemudian dilakukan isolasi DNA dan PCR menggunakan primer 16sRNA, band muncul dengan densitas tebal menandakan terdapat bakteri di isolate tersebut. Hasil ini rencananya akan disequensing untuk mengetahui urutan nukleotida dan dibandingkan dengan urutan primer dari spesies *Lactobacillus plantarum*, *acidophilus*, *rhamnosus*.

Hasil NGS menekankan bahwa terdapat perbedaan yang nyata dari taksonomi mulai dari filum sampai dengan spesies antara kelompok Kontrol dan kelompok fermentasi sambal lalapan 14 hari. Jumlah spesies mikroba pada kelompok kontrol adalah 1110 sementara di kelompok fermentasi 92 spesies. Biodiversitas dari uji alfa diversitas baik richness maupun evenness menunjukkan bahwa di kelompok control lebih beragam dibandingkan kelompok fermentasi. Pada kelompok control dijumpai beberapa bakteri patogen seperti *klebsiella pnemumoniae* namun tidak ditemukan di kelompok fermentasi. Tiga spesies Bakteri asam laktat dominan pada kelompok fermentasi adalah *Lactiplantibacillus plantarum* (48%), diikuti dengan *Weissella*, dan *Leuconostococcus*.

Progres penelitian selanjutnya yaitu penelitian In Vivo (UB) dan In Vitro (UM) akan dilaksanakan bulan Agustus sampai akhir tahun.

Kata kunci: Fermentasi Sambal Lalapan, Penyakit Jantung Koroner, Halal

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
RINGKASAN.....	2
DAFTAR ISI.....	5
BAB 1. PENDAHULUAN.....	7
1.1 Latar Belakang Masalah	7
1.2 Tujuan Penelitian.....	9
BAB 2. METODOLOGI PENELITIAN	10
2.1 Rancangan Penelitian.....	10
2.2 Waktu dan Lokasi Penelitian	11
2.3 Variabel dan definisi operasional penelitian	11
2.4 Sampel penelitian	14
2.5 Prosedur Penelitian	14
2.5.1 Penetapan Formula Racikan Sambal Lalapan.....	14
2.5.2 Prosedur Fermentasi Sambal Lalapan.....	15
2.5.3 Prosedur Uji Organoleptik.....	16
2.5.4 Prosedur Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)	17
2.5.5 Pemurnian Bakteri.....	18
2.5.6 Prosedur pewarnaan gram	19
2.5.7 Prosedur pewarnaan endospore	20
2.5.8 Prosedur Uji Biokimia	21
2.5.9 Prosedur NGS	22
2.5.10 Prosedur Pembuatan Simplisia Fermentasi Sambal Lalapan	23
2.5.11 Prosedur sistematik review	23
2.5.12 Prosedur Ekstraksi Fermentasi Sambal Lalapan.....	24

2.5.13 Pengukuran kadar flavonoid dan fenol	25
2.5.14 Pengukuran kadar antioksidan Uji DPPH	25
2.5.15 Prosedur Uji organoleptik	25
2.5.16 Prosedur uji <i>in silico</i>	25
2.5.17 Prosedur uji viabilitas	27
2.5.18 Pembuatan Kelinci Model Aterosklerosis	27
2.5.19 Prosedur Pemeriksaan Parameter uji <i>in vivo</i>	27
2.6 Analisis data	27
2.7 Alur Penelitian	27
BAB 3. HASIL PENELITIAN	31
3.1 Karakterisasi pH fermentasi sambal lalapan	31
3.2 Uji Organoleptik Fermentasi Sambal Lalapan	31
3.3 Karakterisasi morfologi dan biokimia Bakteri Asam laktat	33
BAB 4. KESIMPULAN DAN SARAN	1
4.1 Kesimpulan	1
4.2 Saran	1
DAFTAR PUSTAKA	2
LAMPIRAN 1. FORMULIR EVALUASI ATAS CAPAIAN LUARAN	
KEGIATAN	4
Lampiran 2. Format Ringkasan Laporan Kemajuan Program Riset Kolaborasi	
Indonesia 2022	7
Mohon diisi oleh masing – masing Peneliti Utama dan Anggota Peneliti Mitra.....	7
Lampiran 3. Draft Manuskrip 1 RKI	9
Lampiran 4. Publikasi Media Massa.....	25

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Perubahan pada pengelolaan kalsium jantung, disfungsi endotel dan aterosklerosis akibat tingginya stress oksidatif dan inflamasi merupakan proses patologis yang mendasari penyakit kardiovaskuler sebagai peringkat pertama penyebab kematian di seluruh dunia akibat Penyakit Tidak Menular (PTM) (1,2). Agen farmakologis aspirin dan statin belum memberikan hasil yang maksimal, serta pada (3) penggunaan jangka panjang terbukti memiliki beberapa efek samping serius diantaranya adalah rhabdomyolisis, miopati, dan ulkus peptikum (4,5). Karenanya, dibutuhkan inovasi untuk dapat menekan proses patologis dari Penyakit Jantung Koroner (PJK) berupa pengembangan terapi suportif berbasis pangan fungsional yang terbukti aman untuk dikonsumsi jangka panjang.

Lalapan (kubis, timun kemangi) dan sambal dengan komposisi bawang merah, bawang putih, tomat, cabe rawit merupakan salah satu menu khas Indonesia yang merupakan bagian budaya lokal dan terbukti dapat memperbaiki profil lipid, menurunkan inflamasi dan stress oksidatif karena kandungan antioksidannya (6–9). Namun sayangnya, teknik pengolahan sambal seperti penggorengan suhu tinggi dalam waktu lama menyebabkan manfaat senyawa fitokimia dari bahan alam hilang ditambah dengan peningkatan kadar lemak jenuh akibat proses penggorengan (10).

Sayuran yang dijadikan bahan lalapan seperti kubis, timun dan kemangi kerap tidak bisa disimpan dalam waktu lama. Karenanya, upaya untuk memaksimalkan khasiat penggunaan lalapan dan sambal dengan teknik fermentasi merupakan terobosan baru yang perlu dikaji(3). Secara garis besar fermentasi asam laktat dari sayur dan buah lazim digunakan untuk peningkatan kandungan nutrisi bahan bakunya (11). Mekanisme kerja fermentasi diperantarai oleh peptide bioaktif yang disintesis pada saat proses degradasi microbial bakteri yang terlibat dalam proses fermentasi yaitu VPP, IPP, dan Exopolisakarida (12).

Selain optimasi metode fermentasi dan ekstraksi sambal lalapan yang menjadi keterbaruan penelitian ini, mekanisme kerja ekstrak fermentasi sambal lalapan dalam menekan proses molekuler dari inflamasi dan stres oksidatif di jantung dan pembuluh darah yang menyebabkan dysregulation pengelolaan kalsium jantung, disfungsi

endotel, dan aterosklerosis sebagai etiologi dari penyakit kardiovaskuler juga akan diinvestigasi. Pengelolaan kalsium jantung ditandai dengan overload kalsium intrakardiak akibat downregulasi dari SERCA2A, peningkatan ekspresi dan aktivitas LTCC, RyR, dan disfungsi pompa Na⁺CA ATPase(13). Disfungsi endotel dan pembentukan sel busa adalah tanda dari fase awal aterosklerosis di pembuluh darah.

Longgarnya ikatan antara sel endotel yang berdekatan, aktivasi sel endotel ditandai dengan ekspresi dari selektin dan integrin (VCAM), penurunan produksi NO, peningkatan factor koagulasi, peningkatan aktivitas trombogenik dan penurunan aktivitas fibrinolisis (14,15). Sel busa sebagai penanda awal sekaligus sel yang menentukan progresivitas aterosklerosis terbentuk akibat peningkatan ambilan oxLDL oleh CD36, SRA, penurunan pengeluaran kolesterol makrofag akibat downregulasi ABCA1, ABCG1, dan penurunan fungsi enzim NCEH, ACAT makrofag(16)(17)(18,19).

Sebagai bagian dari penelitian komprehensif dan holistic untuk hilirisasi produk, lebel label halal menjadi isu yang juga diangkat sebagai bagian dari proses penelitian ini dikarenakan mayoritas konsumen dari inovasi produk fermentasi sambal lalapan adalah masyarakat Indonesia dengan komposisi penganut agama Islam, selain minat terhadap produk halal yang juga semakin meningkat di negara nonmuslim. Produksi dan konsumsi Halal adalah wajib bagi semua Muslim. Penelitian ini merumuskan model dengan cara menentukan titik titik kritis proses fermentasi sambal lalapan sesuai kriteria halal yaitu: (1)Bahan aman dan bebas dari etanol, darah, babi, karnivora, hewan omnivora dan bagian tubuh manusia; (2) Kebersihan maksimum dan kontaminasi minimum dengan potensi racun, Najis (ritual najis) dan Khabith (najis); (3) Proses penanaman, pembuatan, penyiapan, pengemasan, penyimpanan, dan distribusi, harus dipastikan bersih, murni dan sesuai dengan syariat; (4) Seluruh produksi halal harus dipisahkan secara fisik dari produksi non halal; (5) Potensi kontaminasi silang antara bahan Halal dan non-Halal dihindari(20,21).

Penelitian ini berorientasi kepada penemuan suatu model atau postulat baru yang mendukung suatu proses teknologi, kesehatan, pertanian, dalam rangka mendukung penelitian terapan untuk penemuan terapi suportif dalam tatalaksana pencegahan maupun bagian pengobatan suportif penyakit kardiovaskuler.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui karakteristik fisikokimia dari Fermentasi Sambal Lalapan (FSL)
2. Mengetahui penerimaan produk makanan Fermentasi Sambal Lalapan di masyarakat.
3. Mengidentifikasi profil mikroba dari Fermentasi Sambal Lalapan
4. Mengidentifikasi keberadaan bakteri asam laktat dari Fermentasi Sambal Lalapan.
5. Mengetahui kadar flavonoid, fenol dari ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan.
6. Mengidentifikasi senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan.
7. Menetapkan titik kritis halal pada proses Fermentasi Sambal Lalapan
8. Mengetahui tingkat pengetahuan pelaku usaha yang bergerak di bidang fermentasi tentang alur penetapan halal suatu produk fermentasi.
9. Mengidentifikasi gambaran profil fisikokimia, kemiripan obat, aktivitas biologis, afinitas ikatan antara senyawa aktif utama timun, kemangi, cabai, tomat, bawang merah dengan Selektin, vCAM, CD36, SRA, Angiotensin Reseptor.
10. Mengetahui kadar antioksidan dari ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan.
11. Membuktikan adanya pengaruh ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan terhadap profil metabolic (BB, GDA/P, Kolesterol total, TG, LDL, HDL) kelinci dengan diet tinggi lemak.
12. Membuktikan adanya pengaruh ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan terhadap gambaran histopatologi ventrikel jantung dan pembuluh darah kelinci model atherosclerosis.
13. Membuktikan adanya pengaruh ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan terhadap inhibisi inflamasi sistemik TNF, IL6 dan stress oksidatif .
14. Membuktikan adanya pengaruh ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan terhadap profil ekspresi gen aterosklerosis (CD36, ABCA1, NCEH, ACAT), pengelolaan kalsium jantung (RyR2, SERCAa2), disfungsi endotel (vCAM, iCAM) pada kelinci yang dipapar dengan diet tinggi lemak

BAB 2. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan kombinasi penelitian deksriptif untuk melihat profil metabolit sekunder dan bakteri asam laktat fermentasi sambal lalapan, *in silico* dan penelitian eksperimen murni dengan desain *in vitro* dan *in vivo*. Penelitian *in silico* terdiri dari penelitian deskriptif dan docking molekuler menggunakan kelompok control. Penelitian deksriptif *in silico* bertujuan untuk mengetahui karakteristik fisikokimia, ADME, druglikeness, prediksi aktivitas biologis dari senyawa aktif pada fermentasi sambal lalapan. Penelitian *in silico docking* molekuler menggunakan model spesifik *docking* menggunakan kontrol statin. Penelitian eksperimen dalam rangka optimasi metode fermentasi sambal lalapan menggunakan 4 perlakuan (K, P1, P2, P3, P4).

Penelitian untuk menentukan gambaran profil metabolit sekunder dari fermentasi sambal lalapan merupakan penelitian deskriptif dimana data disajikan secara kualitatif (gambar) dan kuantitatif. Penelitian eksperimen uji antioksidan dan *in vitro* menggunakan desain *post-test only* dengan kontrol. Kontrol adalah sel dengan pemberian medium lengkap, sementara 8 Perlakuan dibedakan berdasarkan pemberian EFSL dosis 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560 µg/ml inkubasi selama 24 jam. Penelitian eksperimen *in vitro* sampel dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu kelompok sel normal tanpa perlakuan apapun, kelompok kontrol negatif (K-) adalah kelompok sampel makrofag Raw264.7 yang dipapar oxLDL. Kelompok ketiga adalah kelompok kontrol positif (K+) adalah kelompok sampel yang tidak hanya diperlakukan sesuai model aterosklerosis namun juga dipapar dengan statin. Kelompok 4, 5, 6 adalah kelompok sampel yang dipapar dengan oxLDL/LPS pada *in vitro* ditambah dengan pemberian ekstrak fermentasi sambal lalapan (EFSL) dosis 1, 2, 3.

Penelitian eksperimen *in vivo* dibagi dalam 6 kelompok, yaitu kelompok sel normal tanpa perlakuan apapun, kelompok kontrol negatif (K-) adalah kelompok sampel dengan perlakuan pemberian model aterosklerosis kelinci dengan diet tinggi lemak. Kelompok ketiga adalah kelompok kontrol positif (K+) adalah kelompok sampel yang tidak hanya diperlakukan sesuai model aterosklerosis namun juga

dipapar dengan statin. Kelompok 4, 5, 6 adalah kelompok sampel yang dipapar dengan diet tinggi lemak pada kelinci ditambah dengan pemberian EFSL dosis 1, 2, 3.

2.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak Mei-Desember 2022. Terdapat beberapa lokasi pengerjaan penelitian diantaranya :

1. Laboratorium Halal UM
2. Laboratorium ISDB UM
3. Biosains UB
4. Laboratorium Riset FKIK UIN
5. Laboratorium Farmakologi Unair
6. TDC Unair

2.3 Variabel dan definisi operasional penelitian

Tabel 2.1 Variabel dan definisi operasional penelitian

Variabel	Nama variabel	Definisi operasional	Satuan/skala ukur
TAHAP optimasi fermentasi sambal lalapan			
Independen	Fermentasi alami	Fermentasi sambal lalapan menggunakan garam dan pengaturan suhu serta durasi waktu	Kadar pH Kadar prebiotik
Dependen	Kadar flavonoid	Jumlah total flavonoid hasil ekstraksi fermentasi sambal lalapan	GAE/g Spektrofotometri UV VIS dan KLT numerik
	Kadar polifenol	Jumlah total fenol hasil ekstraksi fermentasi sambal lalapan	Spektrofotometri UV Vis dan KLT numerik
	Kadar antioksidan	Kadar antioksidan hasil ekstraksi fermentasi sambal lalapan	DPPH ELISA numerik
TAHAP PENELITIAN <i>in silico</i>			
Independen	Senyawa aktif fermentasi sambal lalapan	Data Pubchem dari urutan asam amino senyawa aktif komposisi sambal lalapan	
Dependen	Afinitas ikatan dengan Vcam, selektin, SRA, CD36,	Kekuatan ikatan antara senyawa aktif dengan Selektin dan integrin, Angiotensin reseptor yang	Kkal/mol

	Angiotensin reseptor	diekspresikan oleh sel endotel sebagai tanda disfungsi endotel; Scavenger receptor CD36, SRA yang berperan pada pengambilan oxLDL fase awal aterosklerosis	
	Karakteristik fisikokimia	Hukum Lipinski, profil ADME dari senyawa aktif komposisi sambal lalapan	
TAHAP 3 PENELITIAN <i>in vivo</i>			
Variable independen	Dosis ekstrak	Konsentrasi ekstrak fermentasi sambal lalapan 3 dosis	
Variable dependen	Profil lipid	Kolesterol total, LDL, HDL, TG	mg/dL spektrofotometri numerik
	NO	Vasodilator pembuluh darah dimana ketidak seimbangannya menandakan terjadinya disfungsi endotel yang merupakan penanda awal aterosklerosis	mg/dL ELISA numerik
	PAI	Plasminogen activating inhibitor, adalah inhibitor fibrinolysis yang kerjanya mendukung proses koagulasi	ELISA
	lesi aterosklerosis	Warna merah pada aorta mulai dari arkus sampai aorta abdominalis yang menandakan deposit lipid/terbentuknya plak Preparete histo PA	Gambar ImageJ
	Sel busa	Sel makrofag dengan droplet lipid di sitoplasmanya ditandai dengan sel putih dengan banyak vakuola pada sitoplasmanya	% SEM Numerik
	ACAT1	Asil-koenzim A:kolesterol asiltransferase adalah enzim yang mengkatalisis esterifikasi kelebihan kolesterol seluler dengan asam lemak	pg/ml ELISA numerik

	NCEH	enzim kunci yang menekan pembentukan droplet lipid dengan menghilangkan kolesterol dalam sel busa makrofag	Ekspresi relative qPCR numerik
	RyR2	Reseptor ryanodine jantung adalah reseptor yang berada di sarkoplasma berfungsi dengan mengatur pelepasan kalsium dari retikulum sarkoplasma di kardiomyosit, sehingga memainkan peran integral dalam kopling eksitasi-kontraksi. Pada gagal jantung, miokardium tetap dalam keadaan hiperadrenergik kronis. Hal ini menyebabkan protein kinase A hiperfosforilasi reseptor ryanodine dalam kardiomyosit, akhirnya menyebabkan kebocoran kalsium dari retikulum sarkoplasma ke dalam sitosol dan dengan demikian merusak kopling eksitasi-kontraksi.	Jumlah densitas PCR konvensional ImageJ numerik
	SERCA	SERCA adalah Ca ²⁺ ATPase yang mentransfer Ca ²⁺ dari sitosol sel ke lumen SR untuk relaksasi otot jantung	Jumlah densitas PCR konvensional ImageJ numerik
	NOX1, NOX4	Enzim yang menentukan kadar stress oksidatif di jantung dan pembuluhdarah	
TAHAP penetapan kritis halal			
	Kadar pH, kadar lactobasilus, konsentrasi alkohol	Perbandingan dengan standar halal MUI dari kadar pH, kadar laktobasilus dan kadar alkohol	Kadar numerik
	Kadar etanol ekstraksi	Perbandingan dengan standar halal MUI dari kadar etanol hasil ekstraksi	Kadar mg/ml numerik

2.4 Sampel penelitian

Sampel penelitian uji *in vivo* adalah kelinci New Zealand jantan usia 2-3 bulan dengan berat 250-300 g. Kelinci ini diperoleh dari BPOM Jakarta. Adapun kriteria eksklusi dalam penelitian yaitu kelinci sakit dan mati sebelum penelitian berakhir. Estimasi besarnya sampel sesuai dengan rumus Federer: $(p-1)(r-1) > 15$, dengan faktor koreksi 20%, didapatkan total 5 ekor kelinci/perlakuan. Sehingga total diperlukan sebanyak 30 kelinci.

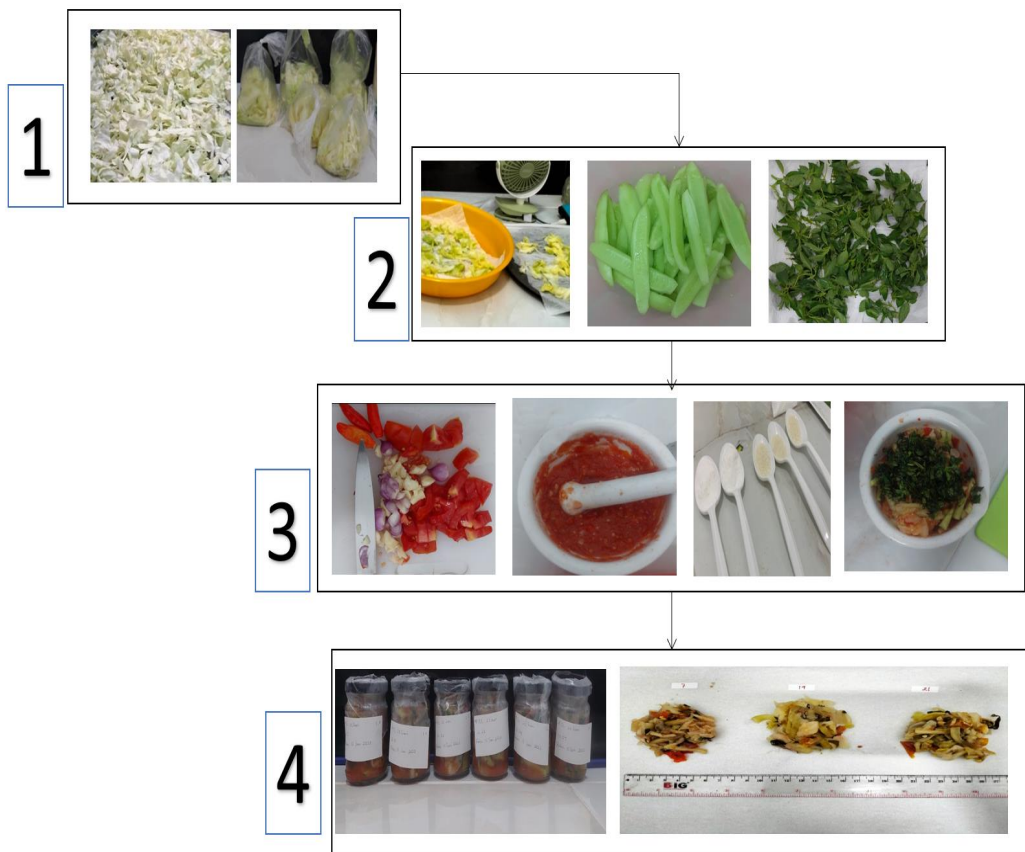
2.5 Prosedur Penelitian

2.5.1 Penetapan Formula Racikan Sambal Lalapan

Penetapan formula bahan bahan alam dalam pembuatan sambal lalapan adalah didasarkan pada resep tradisional dan kajian literatur fermentasi sayuran dengan menggunakan bahan utama berupa kubis putih dan timun. Resep lalapan dan sambal Tabel 1

Tabel 2. Resep Produk Fermentasi Sambal Lalapan

No	Bahan	Jumlah (g) dan persentase
1.	Kubis	100 (34%)
2.	Timun	95 (32%)
3.	Kemangi	10 (3,42%)
4.	Bawang merah	10 (3,42%)
5.	Bawang putih	10 (3,42%)
6.	Tomat	50 (17%)
7.	Cabe rawit	10 (3,42%)
8.	Gula	2,5 (1%)
9.	Garam	5 (2%)
	Total	292



Gambar 2.1 Tahapan proses pembuatan fermentasi sambal lalapan dan hasil fermentasi natural 7, 14, 21 hari

2.5.2 Prosedur Fermentasi Sambal Lalapan

Fermentasi adalah salah satu metode pemrosesan makanan yang paling kuno dan ekonomis di dunia dan didefinisikan sebagai sebuah teknologi di mana pertumbuhan dan aktivitas metabolisme mikroorganisme digunakan untuk mengawetkan makanan (Nuraida 2015; Terefe 2016; Wilburn dan Ryan 2017). . Fermentasi makanan dapat dibagi menjadi dua kategori: fermentasi aerobik,

seperti: fermentasi jamur dan basa, dan anaerobik, seperti: alkohol dan asam laktat (Nout 2014). Pembagian lain dari metode fermentasi makanan yaitu fermentasi alami dan fermentasi penambahan kultur starter. fermentasi spontan”, dimana mikroorganisme hadir secara alami dalam makanan mentah atau lingkungan pengolahan, misalnya asinan kubis, kimchi, dan produk kedelai fermentasi tertentu. Kedua, makanan dapat difermentasi melalui penambahan kultur starter, misalnya kefir, kombucha dan natto [2]. fermentasi kubis lazimnya disebut saurkreat dan timun pickle umumnya menggunakan metode fermentasi alami, karenanya penelitian ini menggunakan teknik fermentasi spontan.

Penggaraman menggunakan Teknik dry salting dilakukan menambahkan garam 2%-3%. Waktu fermentasi yang dipilih adalah 7, 14, 21 hari. Thakur 2020 menyebutkan bahwa fermentasi kubis terbaik berada di suhu 15-20°C. Hal ini juga sama dengan pada metode fermentasi timun yang menghasilkan profil organoleptic terbaik pada suhu 20°C.

2.5.3 Prosedur Uji Organoleptik

Ada 4 jenis sampel produk yang akan diuji. Dengan jumlah panelis 27 orang dewasa panelis tidak terlatih ⁽¹⁾⁽³⁾. Ketentuan panelis (kriteria inklusi untuk panelis) berdasarkan SNI 01-2346-2006. Waktu uji yaitu antara pukul 08.00 – 10.00 WIB. Pelaksanaan penilaian uji mutu organoleptik menggunakan sistem single blind, tidak mengetahui taraf-taraf perlakuan pada sampel yang diujikan. Inklusi panelis yaitu dapat mengkonsumsi makanan asam dan pedas.

Langkah uji organoleptik yaitu panelis memasuki ruangan dan menempati tempat yang telah disediakan (karena keterbatasan fasilitas laboratorium untuk uji organoleptik maka setiap panelis didampingi oleh seorang pengawas dan diberikan jarak antar panelis)

1. Peneliti mengintruksikan panelis untuk mengisi inform consent mengikuti uji organoleptic
2. Peneliti menjelaskan pengisian form organoleptic. Penilaian tingkat hedonic dan mutu hedonic pada suatu produk dan tidak membandingkan produk satu dengan produk lainnya

3. Panelis mulai menilai sampel pengujian sesuai dengan petunjuk pengisian form. Panelis dapat meninggalkan ruangan jika telah selesai melakukan pengujian



Gambar 2.2 Proses Uji Organoleptik Fermentasi Sambal Lalapan

2.5.4 Prosedur Isolasi Bakteri Asam Laktat (BAL)

Isolasi Bakteri asam laktat dimulai dari pembuatan medium MRSA dan MRSB, autoklaf medium. Medium disimpan di kulkas 4C sampai dengan akan digunakan. Ketika akan digunakan MRSA dipanaskan sampai gel kembali mencair. Sampel fermentasi diambil sebanyak 5 gram, kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan mortal dan dilarutkan ke dalam 50 ml NaCl steril. Dilakukan serial dilusi sampel. Siapkan 6 tabung reaksi dan diisi masing-masing dengan 9 ml NaCl. Ke dalam tabung 1 ditambahkan 1 ml sampel yang telah dilarutkan. Lakukan pencampuran dengan cara pipetting kemudian dipindahkan ke tabung selanjutnya, pipetting lagi, pindahkan ke tabung ke 3 sampai tabung ke 6. Akan dihasilkan konsentrasi sampel 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6.

Setelah selesai melakukan serial dilusi, ambil 1 ml sampel dilusi dari pengencerah 10-4, -5, -6 dan pindahkan ke dalam petri dish steril (duplo). Setelah itu

tuang medium MRSA ½ petridish, lakukan *gently mixing* dengan membentuk angka 8. Tutup *petridish* dan biarkan medium mengeras membentuk gel. *Wrap petridish*, letakkan terbalik, masukkan ke dalam kotak yang telah diisi absorbent CO₂. Masukkan *petridish* ke dalam inkubator suhu 37°C, inkubasi 24 jam.

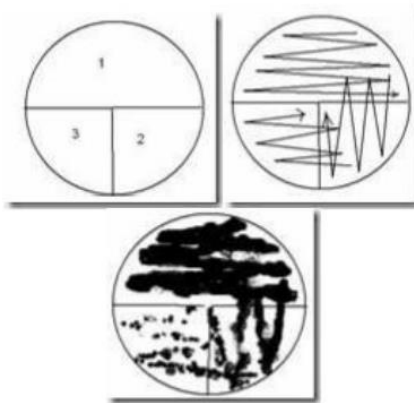


Gambar 2.3 Proses kultur bakteri di LAF

Bakteri asam laktat biasanya akan memberikan bentuk bulat dengan area sekitar membentuk clear zone. Setelah dipastikan terdapat clear zone, maka dilakukan tahapan berikutnya yaitu pemurnian bakteri.

2.5.5 Pemurnian Bakteri

Pengamatan hasil isolasi bakteri di medium MRSA. Siapkan medium MRSA yang sudah dicairkan ke dalam BSC, kemudian tuang medium ke *petridish*. Tunggu sampai mengeras. Bakteri yang ada di petri dish Langkah 1. Metode pemurnian ini menggunakan Teknik spread. Tipe goresan T digunakan untuk mendapatkan koloni tunggal dengan membagi wilayah goresan menjadi 3. Cara kerja: Tandai bagian luar-bawah cawan petri dengan membagi cawan menjadi 3 bagian menggunakan spidol marker, inokulasi daerah 1 dengan streak zig-zag. Panaskan jarum ose dan tunggu dingin, kemudian lanjutkan streak zig-zag pada daerah 2. Cawan diputar untuk memperoleh goresan yang sempurna. Goresan ose di buat irisan zigzag 4 kuadran. Wrap *petridish*, kemudian masukkan ke dalam incubator 37C.



Gambar 2.4 Teknik Spread

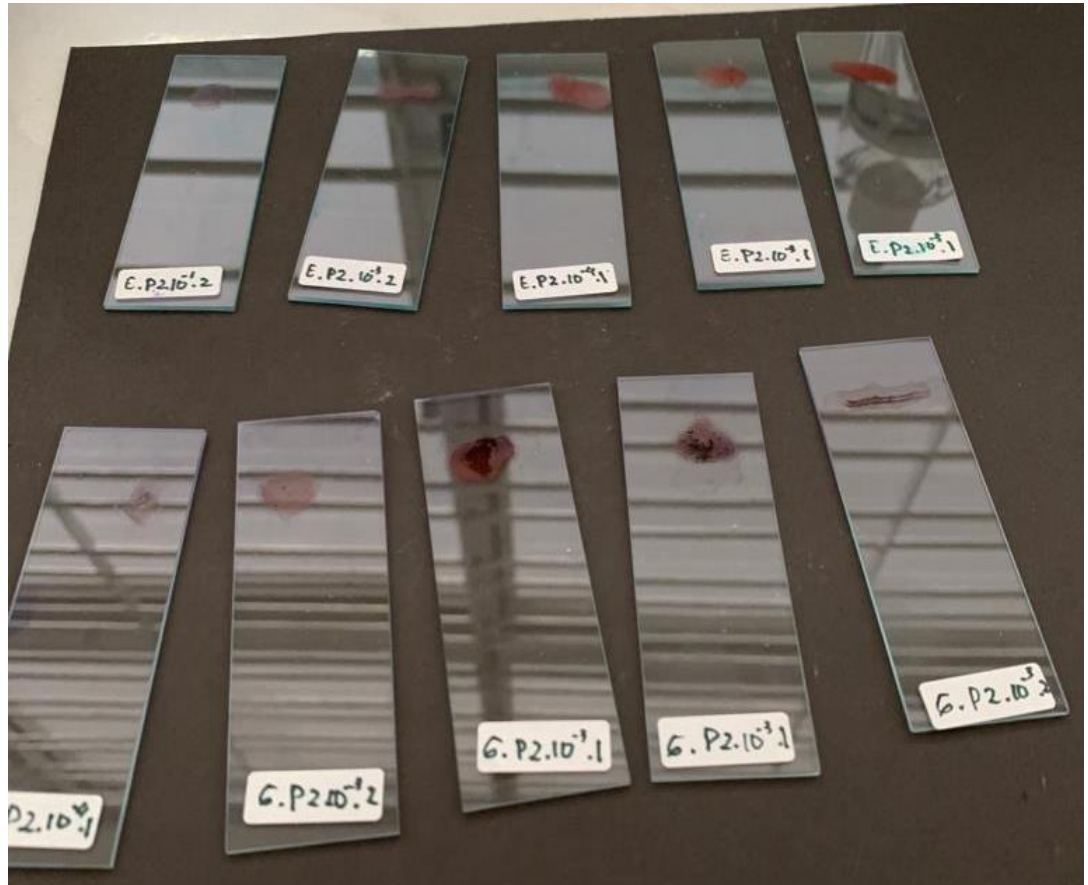
2.5.6 Prosedur pewarnaan gram

1. Bersihkan objek gelas menggunakan alkohol 70% dan tissue untuk menghilangkan noda dan lemak yang menempel. Beri label gelas benda yang kering dan bersih
2. ambillah dengan jarum ose satu bagian kecil kultur dan letakkan di tengah gelas benda yang sebelumnya telah diberi aquadest steril/NaCl dan ratakan
3. Biarkan kering dengan mengangin-anginkan gelas benda
4. Fiksasi pulasan bakteri dengan melewati di atas nyala bunsen (hati-hati, jangan sampai terlalu kering/gosong), tergantung jenis pengecatannya.
5. Teteskan cat *crystal violet* (Gram A) dan diamkan 60 detik. Buanglah sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir.
6. Teteskan larutan iodine (Gram B) dan diamkan selama 60 detik. 6. Buang sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir
7. Teteskan larutan peluntur yaitu alkohol (Gram C) diamkan kira-kira 30 detik.(hati-hati jangan sampai berlebihan yang mengakibatkan kesalahan hasil).
8. Buang sisa cat dan cuci sisanya dengan air mengalir
9. Teteskan safranin (Gram D) dan diamkan selama 60 detik.
10. Cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dengan cara mengangin-anginkan di udara dan keringkan sisa airmenggunkana kertas tisu.
11. Amati menggunakan mikroskop perbesaran lemah sampai perbesaran kuat (1000x) dan ditetaskan minyak immersi. Catat bentuk sel (Gambar 13) dan sifat Gramnya

2.5.7 Prosedur pewarnaan endospore

Langkah-langkah:

1. Buat preparat apusan/pulasan bakteri
2. Siapkan beaker glass berisi air dan didihkan air dengan hot plate. Letakkan kawat ram diatas beaker glass
3. Letakkan preparat bakteri di atas kawat ram dan tutup dengan kertas saring/kertas tisu
4. 4. Teteskan larutan malachite green diatas kertas tisu hingga basah.
5. Biarkan selama 5-6 menit, tambahkan tetesan pewarna malachite green jika kertas tisu terlihat kering (jangan biarkan preparat kering)
6. Pindahkan gelas preparat dan ambil kertas tisu yang menutup preparat.
7. Biarkan hingga agak dingin.
8. Cuci preparat dengan air selama 30 detik, keringanginkan.
9. teteskan pewarna safranin dan diamkan selama 90 detik.
10. Cuci dan bilas pewarna menggunakan air selama 30 detik.
11. Keringanginkan dan amati menggunakan mikroskop pada perbesaran lemah hingga perbesaran kuat (tidak perlu ditutup cover glass). Amati spora dan letak spora. Spora bebas dan endospora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah.



Gambar 2.5 Pewarnaan gram dan

2.5.8 Prosedur Uji Biokimia

Uji katalase

Sampel bakteri diambil dan diletakkan pada *object glass*. Selanjutnya ditetesi H₂O₂ 3%. Diamati apabila terdapat gelembung, maka bakteri dikatakan positif katalase, dan apabila tidak terdapat gelembung maka bakteri dikatakan negatif katalase.

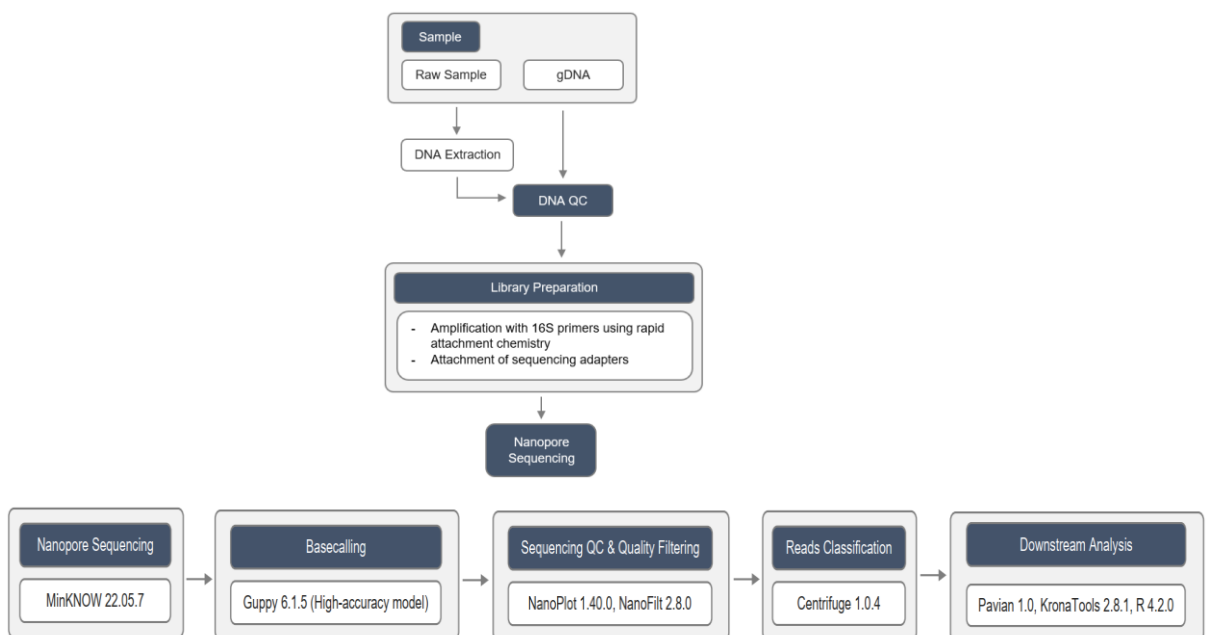
Uji produksi gas

Diambil satu ose bakteri dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi dengan tabung durham dan media MRS broth. Kemudian tabung diinkubasi selama 48 jam dengan suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan melihat terbentuknya gelembung udara pada tabung durham.

2.5.9 Prosedur NGS

Setelah melakukan metode manual untuk mengidentifikasi mikroorganisme yang ditumbuhkan pada agar, penelitian ini juga mengamati profil mikrobioma di dalam fermentasi menggunakan NGS. Ekstraksi DNA genom dari sampel mentah dilakukan menggunakan Zymo BIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, D4300)(24) Konsentrasi DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer NanoDrop dan fluorometer Qubit. Persiapan perpustakaan dilakukan dengan menggunakan Kit dari Oxford Nanopore Technology(25). Sekuensing nanopore dioperasikan oleh perangkat lunak MinKNOW versi 22.05.7. Basecalling dilakukan menggunakan Guppy versi 6.1.5 dengan model akurasi tinggi (25).

Kualitas file FASTQ divisualisasikan menggunakan NanoPlot, dan penyaringan kualitas dilakukan menggunakan NanoFilt (26,27). Bacaan yang difilter diklasifikasikan menggunakan pengklasifikasi Centrifuge. Indeks Bakteri dan Archaea dibangun menggunakan database NCBI 16S RefSeq (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/>). Analisis dan visualisasi hilir dilakukan menggunakan Pavian (<https://github.com/fbreitwieser/pavian>), Krona Tools (<https://github.com/marbl/Krona>), dan R Studio menggunakan R versi 4.2.0 (<https://www.R-project.org/>)(28).



Gambar 2.6 Alur NGS uji eksperimental dan uji bioinformatika

2.5.10 Prosedur Pembuatan Simplisia Fermentasi Sambal Lalapan

Hasil fermentasi sambal lalapan dimasukkan ke dalam flask, kemudian dilakukan *freeze dried* selama 48 jam untuk menghasilkan FSL beku kering yang selanjutnya dibuat menjadi bubuk dan disimpan di -80°C .



Gambar 2.7 Proses pengeringan dengan metode freeze dried dan hasil pengeringan

2.5.11 Prosedur sistematik review

Untuk mendapatkan gambaran yang komprehensif tentang manfaat spesies utama yang ditemukan dalam fermentasi sambal lalapan Indonesia, kami melakukan pencarian literatur sistematis di PubMed, dan database google sarjana yang mengacu pada pedoman PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic review and Meta-Analyses) dari 1 Juli sampai 1 Agustus 2022. Aterosklerosis adalah penyebab PJK yang ditandai dengan peradangan kronis, akumulasi lipid dan elemen berserat di arteri. Progresivitas aterosklerosis dapat ditentukan dengan gambaran lesi histologis dari stadium awal yang terdiri dari sel busa, fatty streak; tahap menengah (pra-ateroma, ateroma), dan lesi lanjutan (plak berserat dan rentan). Oleh karena itu, pendekatan untuk mengembangkan produk pencegahan IHD dengan menghambat perkembangan aterosklerosis tahap awal telah menjadi isu yang muncul saat ini. Beberapa tahapan penting dalam pembentukan sel busa: (1) dislipidemia; (2) disfungsi endotel. Meskipun beberapa penelitian telah meneliti manfaat fermentasi makanan terhadap gangguan metabolisme, namun masih belum ada laporan yang mengidentifikasi target potensial fermentasi ini dalam penghambatan sel busa. metabolit sekunder probiotik fermentasi kemudian digunakan untuk membuat prediksi sifat potensi anti-aterosklerosis. Berdasarkan konsep teoritis, kami

menggunakan beberapa kriteria sebagai kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi harus mencakup fermentasi probiotik DAN dislipidemia disfungsi endotel ATAU aterosklerosis sel busa. Kriteria eksklusi termasuk studi proses dipertimbangkan untuk dimasukkan dalam tinjauan sistematis ini jika memenuhi kriteria berikut: (1) penulis melaporkan data dari studi peer-review asli. (2) catatan; (2) desain in vitro atau in vivo; (3) perlakuan probiotik dalam fermentasi pangan; (4) hasil yang jelas sebagai berikut dislipidemia atau disfungsi endotel atau sel busa yang berhubungan dengan aterosklerosis; (4) model jelas baik model tikus aterosklerosis atau kultur bersama endotel dan makrofag yang terpapar oxLDL. Kriteria eksklusi adalah review, konferensi, dan surat; makanan fermentasi yang tidak termasuk peran probiotik.

2.5.12 Prosedur Ekstraksi Fermentasi Sambal Lalapan

Bubuk beku kering fermentasi sambal lalapan ditimbang, kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol 70% perbandingan 1:10. Setelah itu dilakukan ekstraksi UAE selama 30 menit suhu 25C, serial 3x berhenti setiap 10 menit untuk dilakukan pengadukan. Hasil ekstraksi penyaringan menggunakan whatman paper no.4. rendemen tersebut kemudian dilakukan *rotary evaporator*. Rendemen dimasukkan ke dalam oven suhu. Lama oven menyesuaikan sampai berat rendemen stabil. Dilakukan penimbangan setiap 6 jam. Total rerata waktu yang dibutuhkan adalah 3 hari.





Gambar 2.8 Proses dan Hasil Ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan

2.5.13 Pengukuran kadar flavonoid dan fenol

Kadar total flavonoid/fenol dianalisa dengan metode kalorimetri menggunakan reagen alumunium klorida/Folin Ciocalteu. Senyawa aktif diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometri UV-VIS dan Kromatografi Lapis Tipis.

2.5.14 Pengukuran kadar antioksidan Uji DPPH

Berbagai serial konsentrasi dari ekstrak fermentasi sambal (10-1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$) ditambahkan ke dalam 96 well plate kemudian ditambahkan reagen DPPH 60mM. radikal DPPH ditentukan pada ELISA di panjang gelombang 540 nm. Aktivitas scavenging dihitung dengan menggunakan rumus berikut: Kegiatan scavenging (%) = $[1 - (\text{Asample} - \text{A sample blank}) / \text{Acontrol}] \times 100$.

2.5.15 Prosedur Uji organoleptik

Terdapat 4 perlakuan (K, P1, P2, P3, P4) pada ekstrak fermentasi lalapan sambal. Ketentuan panelis (kriteria inklusi untuk panelis) berdasarkan SNI 01-2346-2006. Pelaksanaan penilaian uji mutu organoleptik menggunakan sistem single blind, tidak mengetahui taraf-taraf perlakuan pada sampel yang diujikan.

2.5.16 Prosedur uji *in silico*

Profil karakteristik fisikokimia dan kemiripan obat Lipinski *Rule of five* (Ro5) dievaluasi menggunakan *software* swissAdme. Format file canocical smiles dari

Pubchem dimasukkan pada situs <http://www.swissAdme.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. Profil bioavailabilitas dikatakan baik jika skoranya ≥ 0.5 . **Prediksi kekuatan afinitas senyawa aktif fermentasi sambal lalapan terhadap CD36 menggunakan *docking* molekuler.** Uji analisis yang digunakan untuk membandingkan prediksi kekuatan senyawa yang ada pada Fermentasi Sambal Lalapan sebagai ligand CD36 terdiri dari beberapa rangkaian kegiatan awal yaitu:

1. Preparasi Ligan, dimana Senyawa aktif Fermentasi Sambal Lalapan yang berperan sebagai ligan di unduh dalam bentuk 3D melalui PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dan kemudian disimpan dalam format SDF (*.sdf).
2. Preparasi protein reseptor, Protein Data Bank CD36 memiliki struktur 3D yang diunduh dari situs <http://www.rcsb.org>. Selanjutnya dihilangkan molekul-molekul yang tidak dibutuhkan seperti air dan ligan, dengan aplikasi Discovery studio dan disimpan dalam format file (*.pdbqt).

Uji *Docking*, *Docking* dilakukan dengan beberapa tahap dengan beberapa software. Tahap pertama memasukkan reseptor ke dalam software Discovery studio dan kemudian formatnya diubah menjadi (*.pdbqt). Tahap kedua memasukkan ligan untuk diminimalisasi dan diubah formatnya menjadi (*.sdf) dengan menggunakan software *open babel*. Metode *docking* yang digunakan adalah *site specific docking*, dimana kontrol untuk CD36 menggunakan molekul FFA, sementara kontrol menggunakan Statin. Tahap ketiga memulai proses *docking* dengan software Autodock Vina dengan cara mengatur grid pada sisi aktif reseptor dan selanjutnya di *running*. Pada tahap terakhir, hasil dari *docking* disimpan dalam format PDB serta data nilai *binding affinity* disimpan dalam format Microsoft Excel.

Visualisasi hasil *docking*. Hasil *docking* divisualisasikan dalam bentuk 3D dan 2D. Software Discovery studio dapat menggambarkan interaksi dalam bentuk 3D dan kemudian dianalisis ikatan yang terbentuk antara senyawa ligan dengan reseptor. Untuk melihat interaksi asam amino yang terjadi serta jenis ikatannya dalam visualisasi 2D.

2.5.17 Prosedur uji viabilitas

Tumbuhkan sel dalam lempeng mikro (tingkat kultur jaringan, 96 sumur, dasar rata) dalam volume akhir 100 l/kultur sumur medium dalam atmosfer yang dilembabkan, seperti +37°C, 5 hingga 6,5% CO₂). Tambahkan 10 l/well Cell Proliferation Reagent WST-1. Inkubasi sel selama 0,5 hingga 4 jam dalam atmosfer yang dilembabkan, seperti +37°C, 5 hingga 6,5% CO₂. Kocok secara menyeluruh selama 1 menit di atas shaker. Ukur absorbansi sampel terhadap kontrol latar belakang sebagai blanko menggunakan microplate (ELISA) ppada 420 hingga 480 nm

2.5.18 Pembuatan Kelinci Model Aterosklerosis

Aklimatisasi 1 minggu. Selama penelitian berlangsung hewan coba akan mendapatkan pakan dan air minum secara ad libitum yang diganti setiap hari. Sedangkan kandang dibersihkan setiap hari. Pelet diet tinggi lemak adalah pellet normal + 2% kolesterol. Kelinci dengan kriteria aterosklerosis yaitu adanya sel busa didapatkan setelah induksi diet tinggi lemak selama 12 minggu.

2.5.19 Prosedur Pemeriksaan Parameter uji *in vivo*

Pengukuran parameter dengan metode Spektrofotometri, qPCR, PCR konvensional, Spektrofotometri, ELISA, Imunositokimia dan Flowsiotmetri,

2.6 Analisis data

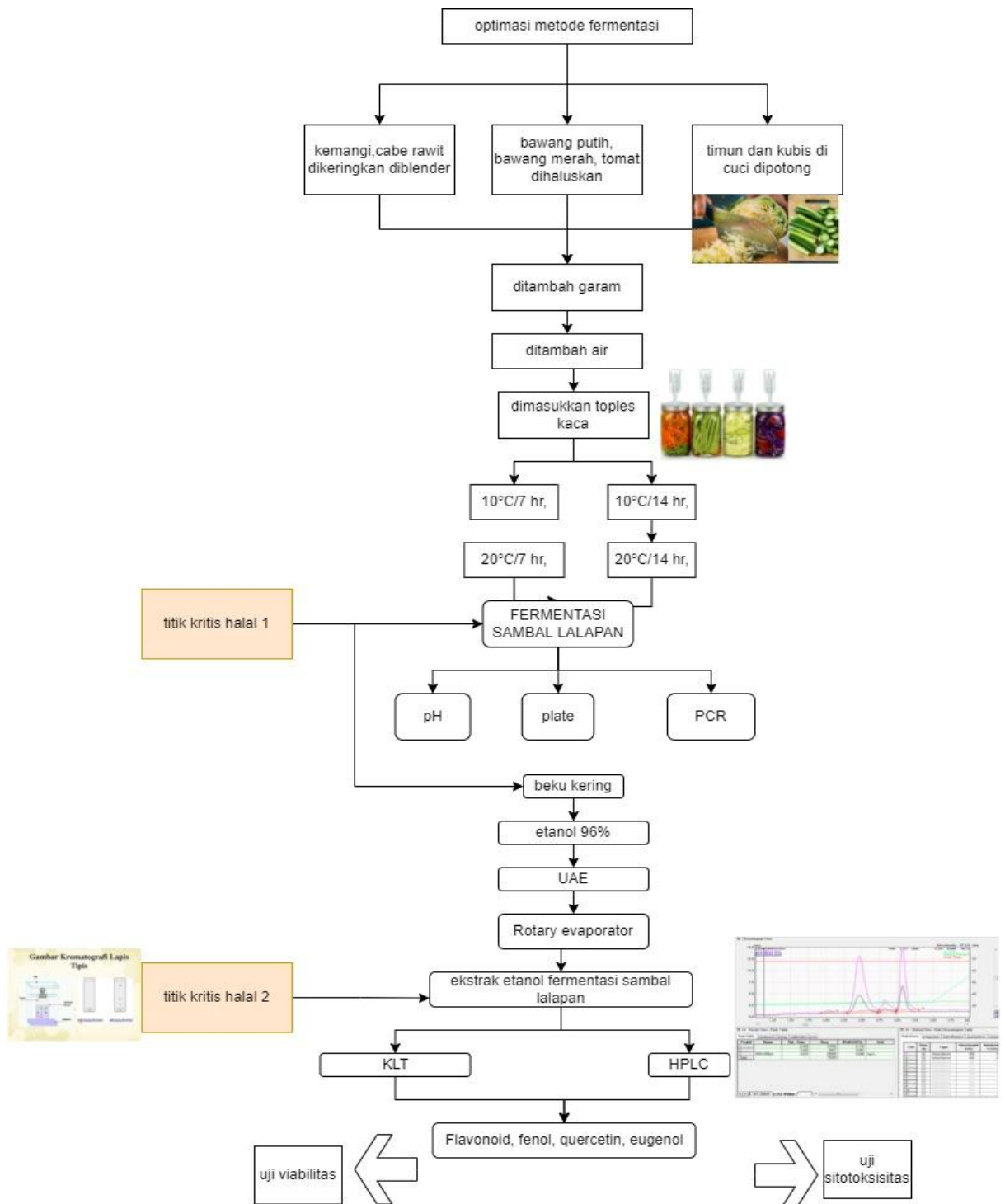
Data disajikan menggunakan statistic deskriptif seperti table frekuensi dan grafik, sementara hipotesis dibuktikan menggunakan uji one-way Anova dengan bantuan SPSS 24.0

2.7 Alur Penelitian

Pelaksanaan penelitian di PT-host

Penelitian di UM memiliki tujuan dalam menentukan optimasi metode fermentasi sambal lalapan, validasi penetapan titik kritis halal pada proses pembuatan EFSL, dan proses ekstraksi, serta perhitungan kadar antioksidan dan uji

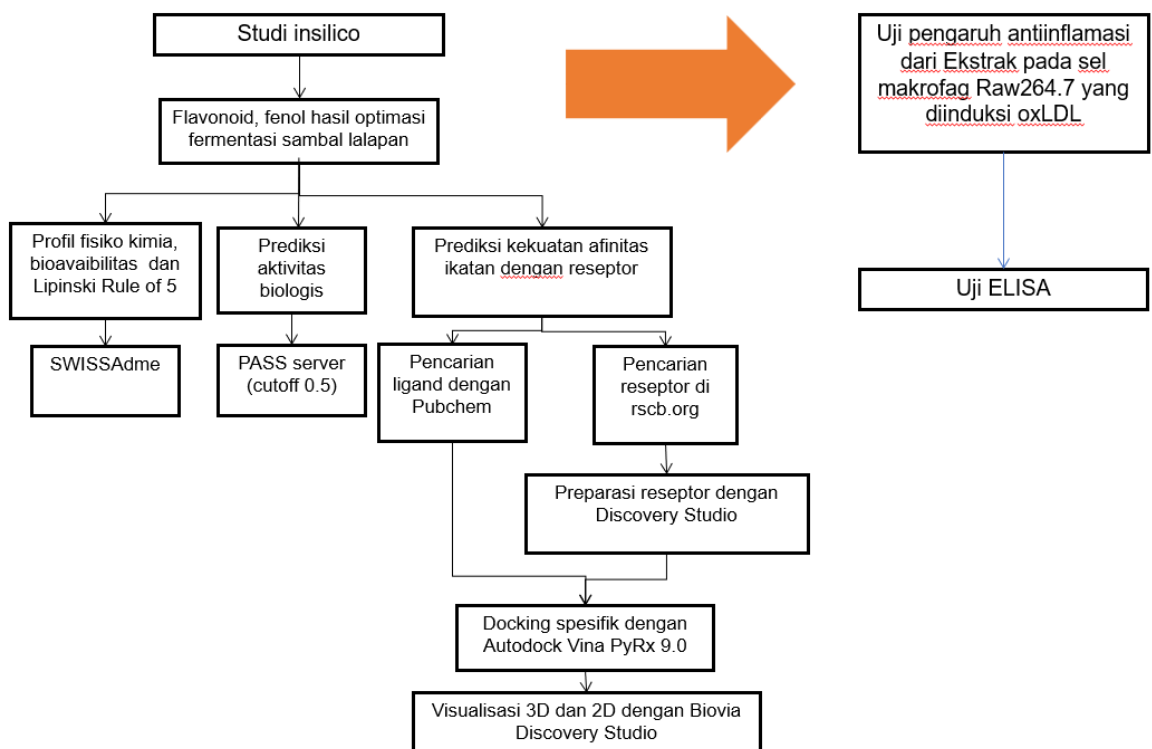
sitotoksitas pada sel normal Penelitian ini direncanakan akan dilakukan di lab Riset Halal UM dan akan dilaksanakan selama 2 bulan.



Gambar 2.9 Alur penelitian di UM

Pelaksanaan penelitian di Unair

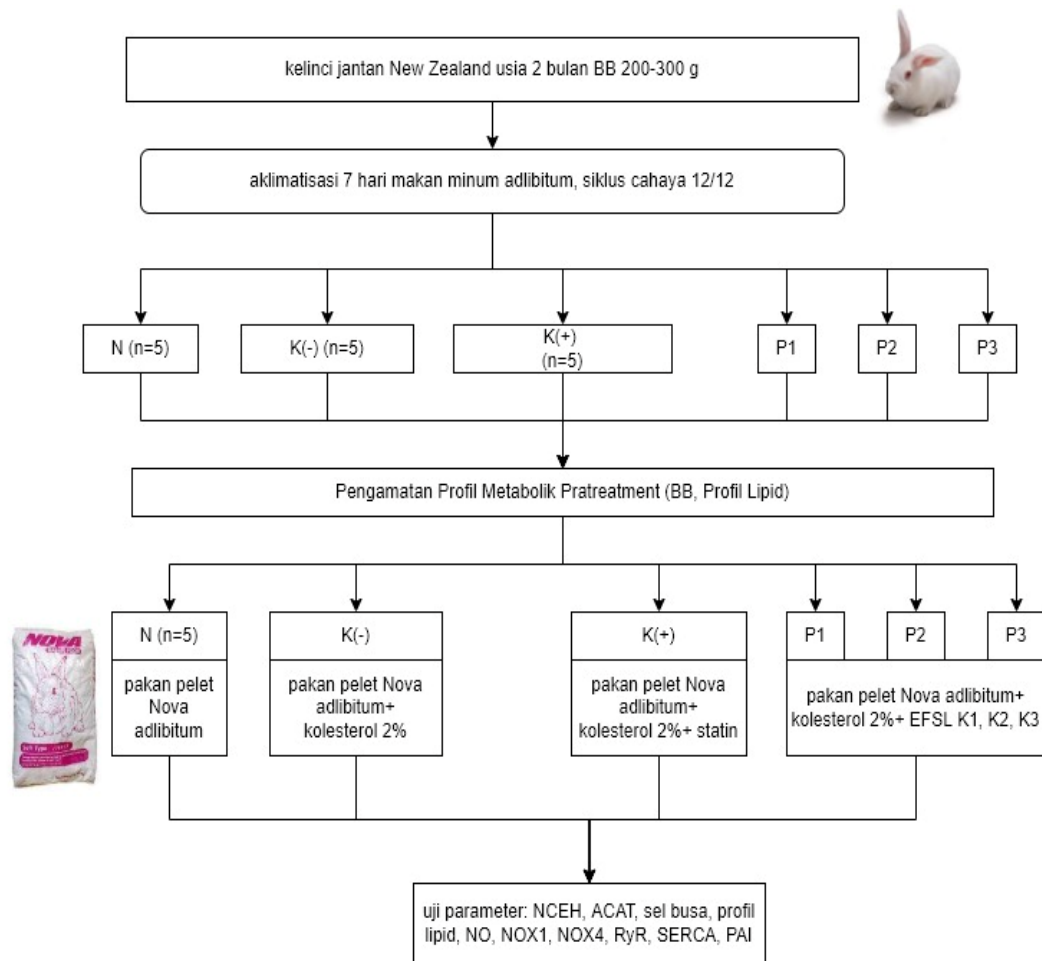
Penelitian di Unair bertujuan untuk melihat senyawa aktif dari fermentasi sambal lalapan, uji prediksi senyawa aktif fermentasi sambal lalapan terhadap disfungsi endotel, pembentukan sel busa aterosklerosis dan pengelolaan kalsium jantung, serta kemampuannya dalam inhibisi inflamasi pada makrofag yang dipapar oxLDL. Penelitian ini akan dilaksanakan di Tropical Disease Center (TDC) dan akan selesai pada kurun waktu 2 bulan. Alur penelitian disajikan pada diagram di bawah ini.



Gambar 2.10 Alur penelitian di Unair

Pelaksanaan penelitian di UB

Penelitian di UB bertujuan untuk melihat mekanisme molekuler secara *in vivo* dengan model hewan coba kelinci yang diberikan diet tinggi lemak. Dilaksanakan di laboratorium Biosains dilaksanakan dalam kurun waktu kurang lebih 3 bulan. Alur penelitian disajikan pada diagram di bawah ini.



Gambar 2.11 Alur penelitian di UB

BAB 3. HASIL PENELITIAN

3.1 Karakterisasi pH fermentasi sambal lalapan

pH merupakan indikator derajat maturasi dari fermentasi sayur. Semakin asam produk fermentasi makanan mudah disterilkan. Disebutkan dalam suatu penelitian, bahwa keberhasilan fermentasi ditentukan jika mendapat nilai pH 3,6. Penelitian lainnya menyebutkan bahwa pH terbaik untuk pematangan fermentasi sayur adalah 4,2-4,4. Perubahan pH merupakan indikator signifikan dari tingkat kematangan kimchi (Cho et al., 2016), kematangan optimal kimchi pada pH 4,2 – 4. Makanan dengan pH di bawah 4,7 sangat tahan bakteri. Dengan demikian, makanan dengan pH rendah mudah disterilkan. Fermentasi menurunkan pH makanan dengan meningkatkan kadar asam laktat yang ada di dalamnya, yang membuatnya aman untuk dikonsumsi. Cuka atau asam lemah lainnya (seperti jus lemon) terkadang ditambahkan selama proses fermentasi untuk memastikan pH makanan tetap pada tingkat yang aman. Proses ini dikenal sebagai pengawetan.

Tabel 3.1 pH hasil fermentasi sambal lalapan

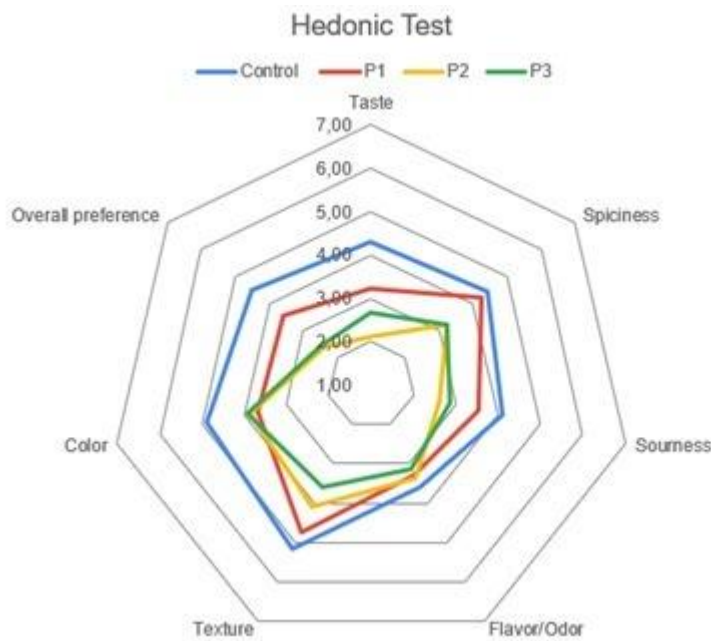
Kelompok Perlakuan	Nilai pH
K	4.726 ± 0.26# [^]
P1	4.358 ± 0.7453* [^]
P2	3,678± 0.06127*#
P3	3,3780± 0,04067*# [^]

3.2 Uji Organoleptik Fermentasi Sambal Lalapan

Uji organoleptik adalah uji sensori merupakan cara pengujian dengan menggunakan indra manusia sebagai alat utama untuk pengukuran daya penerimaan terhadap produk. Uji ini juga menggambarkan karakteristik dari sampel. Terdapat 7 indikator dari uji sensoris ini diantaranya rasa secara keseluruhan, rasa pedas, asam, aroma, tekstur, warna dan kesukaan secara keseluruhan. Hasil uji organoleptik pada 4 kelompok disajikan dalam table 3.2

Tabel 3.2 Hasil uji organoleptik

	Rasa	Rasa Pedas	Rasa Asam	Aroma	Tekstur	Warna	Kesukaan
K	4,30 ± 1,27	4,44±1,15	4,11±1,05	3,59±1,42	5.19±1.08	4,89±1.05	4.52±1.25
P1	3,22 ± 1,58*	4,25±1,16	3.52±0.98*	3,30±1,38	4.74±1.26	3,67±1.14*	3.48±1.39*
P2	2,11 ± 1,09*#	3,22±1,48*#	2.63±1.67*#	3,37±1,67	4.11±1.60*	3,85±1.51*	2.41±1.08*#
P3	2,67 ± 1,74*	3,25±1,65*#	2.85±1.88*#	3,15±1,72	3.59±1.37*#	3,93±1.63*	2.48±1.72*#



Gambar 3.1 Hasil Uji Henodik

Nilai rata – rata kesukaan panelis pada atribut rasa berkisar 4.30 – 2.67 yang artinya panelis cenderung biasa sampai agak suka. Tingkat kesukaan rasa produk kontrol berbeda nyata dengan semua perlakuan produk fermentasi. Tingkat kesukaan rasa produk dengan fermentasi 7 hari lebih tinggi secara nyata dibandingkan dengan tingkat kesukaan produk fermentasi 12 hari. Adanya perlakuan fermentasi menciptakan rasa asam untuk produk Nilai rata – rata kesukaan panelis pada atribut rasa pedas berkisar 4.44 – 3.25 yang artinya panelis cenderung biasa sampai agak suka. Tingkat kesukaan rasa pedas formula kontrol tidak berbeda nyata dengan formula P1 Tidak berbeda nyata pada tingkat kesukaan rasa pedas pada P2 dan P3 . Hal ini menunjukkan adanya rasa pedas

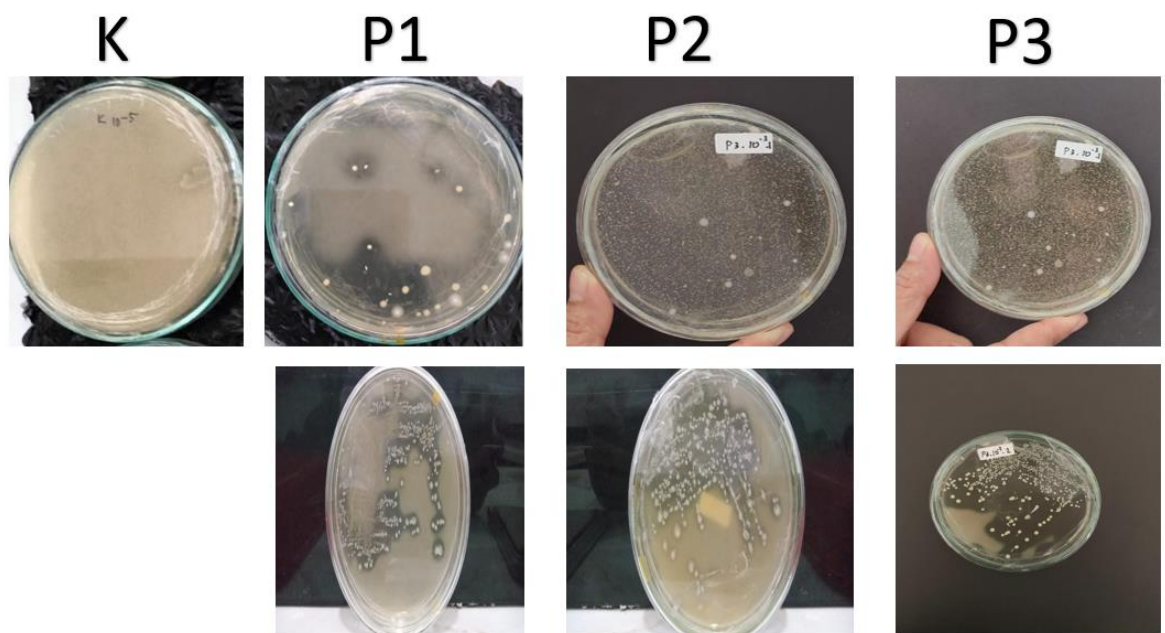
yang sama pada formula kontrol dan P1; P2 dan P3. Tingkat kesukaan tertinggi yaitu pada kontrol dan dilanjutkan dengan formula p1. Nilai rata – rata kesukaan pada atribut rasa asam berkisar 4,11 – 2,85 yang artinya panelis cenderung biasa sampai agak suka Tingkat kesukaan rasa asam pada formula kontrol berbeda nyata dengan semua perlakuan produk fermentasi. Tingkat kesukaan rasa pedas formula P1 lebih tinggi secara nyata dibandingkan tingkat kesukaan formula P2. Nilai rata – rata kesukaan pada atribut aroma berkisar 3,59 -3,15 yang artinya panelis cenderung biasa sampai agak tidak suka Tidak terdapat perbedaan tingkat kesukaan secara signifikan pada ke empat produk. Hal ini menunjukkan semua produk memiliki aroma yang sama. Nilai rata – rata kesukaan pada atribut tekstur berkisar 5.19 – 3,59 yang artinya panelis cenderung agak suka sampai biasa. Tingkat kesukaan tekstur kontrol dengan formula P1 tidak berbeda signifikan $p=0.185$. Terdapat perbedaan signifikan tingkat kesukaan pada produk kontrol dengan P2 dan P3. Tingkat kesukaan tertinggi pada formula perlakuan adalah P1 (4,74 di bulatkan 5 yaitu agak suka). Keempat formula memiliki tekstur yang *crunchy*. Nilai rata – rata kesukaan pada atribut warna berkisar 4,89 – 3,93 yang artinya panelis agak suka sampai biasa. Tingkat kesukaan warna kontrol berbeda nyata dengan semua perlakuan.

Tingkat kesukaan semua perlakuan tidak berbeda nyata antar produk perlakuan (formula P1, P2, dan P3). Warna produk fermentasi memiliki tingkat kesukaan yang sama yaitu biasa, namun berdasarkan rata- rata nilai kesukaan tertinggi pada produk formula P3. Tingkat kesukaan memiliki nilai tinggi 4,89 (agak suka) pada produk kontrol .

3.3 Karakterisasi morfologi dan biokimia Bakteri Asam laktat

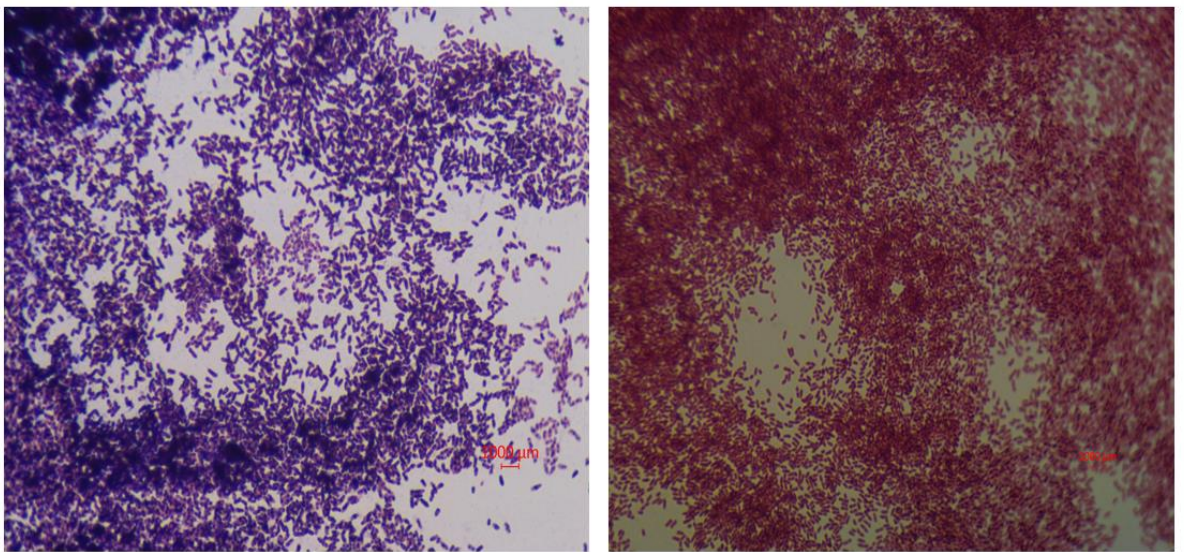
Bakteri asam laktat (BAL) adalah kelompok heterogen mikroorganisme filogenetik terkait erat yang menghasilkan laktat asam sebagai produk utama atau satu-satunya dari fermentasi karbohidrat. BAL adalah Gram positif, nonsporulating, katalase-negatif, asam toleran, tidak bernafas tetapi aerotoleran, biasanya kokus nonmotile atau batang dengan kandungan Guanidine Cytosine (G C) rendah. Kecuali untuk beberapa spesies milik *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, dan *Carnobacterium genera*, LAB bersifat nonpatogenik dengan

status yang umumnya diakui sebagai aman (GRAS) atau food grade. Mikroorganisme ini ditemukan di sejumlah besar lingkungan seperti bahan tanaman dan makanan berbasis susu, daging, dan sereal (fermentasi), saluran pencernaan hewan dan vagina, dan di tanah dan air. Mikroorganisme ini diklasifikasikan berdasarkan morfologi mereka, mode glukosa, fermentasi, kemampuan untuk tumbuh pada suhu yang berbeda, dan penggunaan gula sebagai substrat karbon. Fitur lain, seperti konfigurasi asam laktat yang dihasilkan dan toleransi terhadap garam, asam, dan alkali, juga dipertimbangkan. Menurut taksonomi saat ini klasifikasi BAL termasuk ke dalam filum *Firmicutes*, kelas *Bacillus*, ordo *Lactobacillales*. Keluarga termasuk *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, dan *Streptococcaceae*. Empat genera utama BAL, yaitu *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, dan *Streptococcus*. Namun, revisi taksonomi baru-baru ini telah mengusulkan genera baru berikut: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, dan *Weisella*. Dari semua genera yang disebutkan, *lactobacilli* dan *carnobacteria* adalah batang; genera yang tersisa adalah kokus, kecuali spesies *Weisella*, yang dapat berupa batang atau kokus.



Gambar 3.2 Hasil Kultur BAL

Bakteri asam laktat adalah gram positif. Hasil isolasi tunggal dalam penelitian ini yang dilakukan pengecatan gram, menunjukkan bakteri terwarnai ungu. Hal ini menunjukkan bakteri hasil isolasi merupakan bakteri gram positif. Selanjutnya dilakukan pewarnaan endospore yang merupakan ciri lain dari bakteri asam laktat. Pada pengamatan mikroskop ditunjukkan warna merah pada bakteri. Karenanya, dapat disimpulkan bahwa bakteri ini merupakan bakteri asam laktat.



Gambar 3.3 Pengamatan mikroskop hasil pewarnaan gram dan endospora

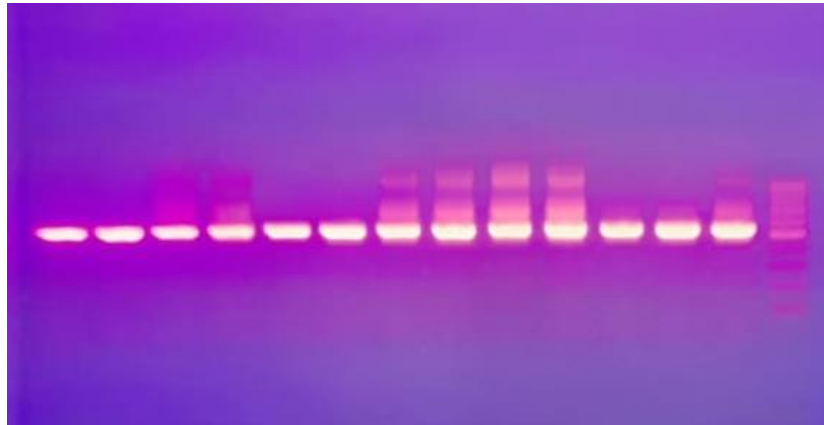
Bukti lain yang mendukung bahwa isolate hasil pemurnian merupakan bakteri asam laktat adalah hasil dari uji biokimia katalase. Bakteri asam laktat memiliki hasil katalase negative. Preparat menunjukkan tidak terbentuk gelembung pada preparat.



Gambar 3.4 Uji Katalase dan Pembentukan Gas

3.4 Produk amplifikasi hasil isolate tunggal Bakteria menggunakan primer 16sRNA

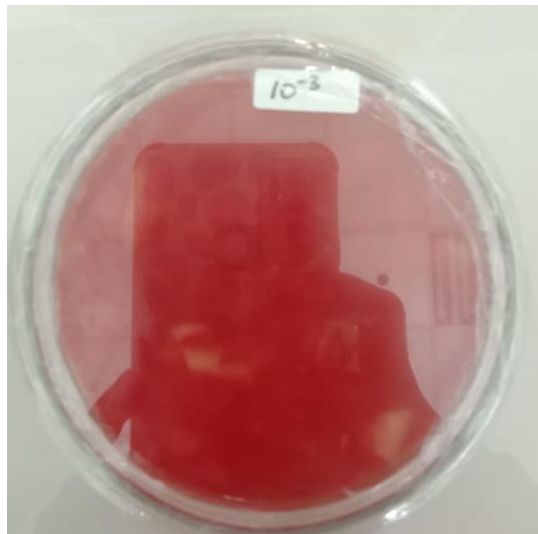
untuk validasi kualitatif maka dilakukan PCR menggunakan sampel FSL tentang keberadaan mikroba menggunakan primer 16sRNA.



Gambar 3.5 Hasil PCR

3.5 Uji pathogen fermentasi asam laktat

Untuk membuktikan secara manual, apakah terdapat bakteri pathogen pada FSL maka dilakukan uji pathogen menggunakan blood agar. Setelah bakteri ditanam 14 hari, tidak ditemukan zona bening pada agar. Hal ini menunjukkan bahwa FSL tidak mengandung bakteri pathogen.

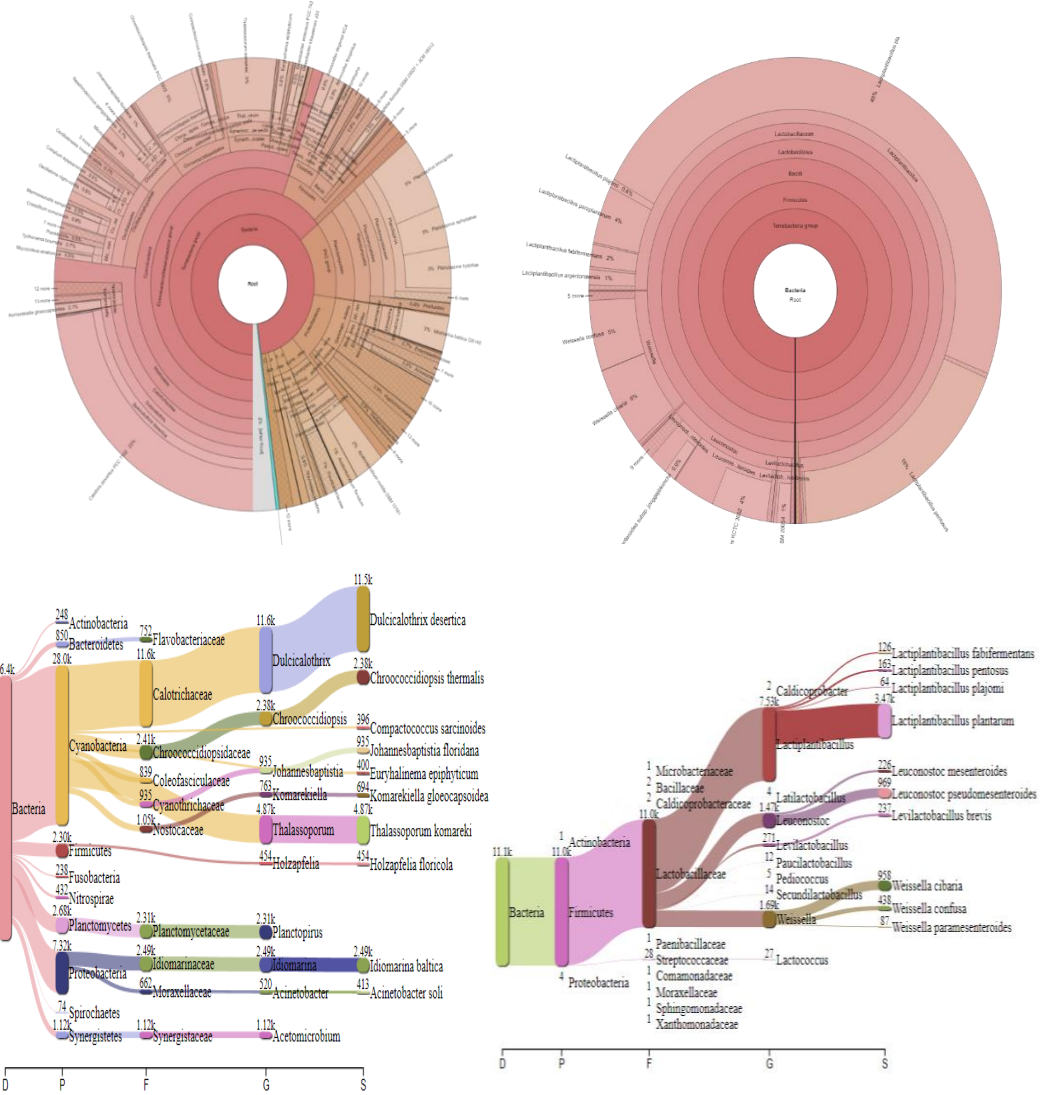


Gambar 3.6 Hasil Uji Patogen

3.6 Profil Mikrobiologi Fermentasi Sambal Lalapan Menggunakan *Next Generation Sequencing* (NGS)

Keamanan pangan dan kualitas pangan merupakan dua hal yang penting bagi konsumen dan juga industry pangan. Tantangan penting terkait dengan

keamanan pangan adalah jaminan keamanan mikrobiologis bahan pangan . Pada tahun 2010, 600 juta insiden infeksi bawaan makanan dilaporkan oleh WHO yang menyebabkan 420.000 kematian. Next Generation Sequencing, telah banyak digunakan dalam berbagai bidang seperti mikrobiologi, diagnostik, forensik dll. Dengan metode *Next Generation Sequencing*, mikrobioma total dari sampel biologis dapat diidentifikasi dan diurutkan. Di bidang foodomics, analisis genomik sampel makanan oleh NGS dianggap akurat, cepat, dan jauh lebih informatif dibandingkan dengan Teknik kultur. Berdasar hasil pH, p14 menghasilkan pH berkisar dari 3,5. Maka untuk kepentingan profiling mikroba FSL menggunakan NGS dilakukan komparasi antara K dan P2 (FSL 14 hr). Berikut hasil dari NGS :



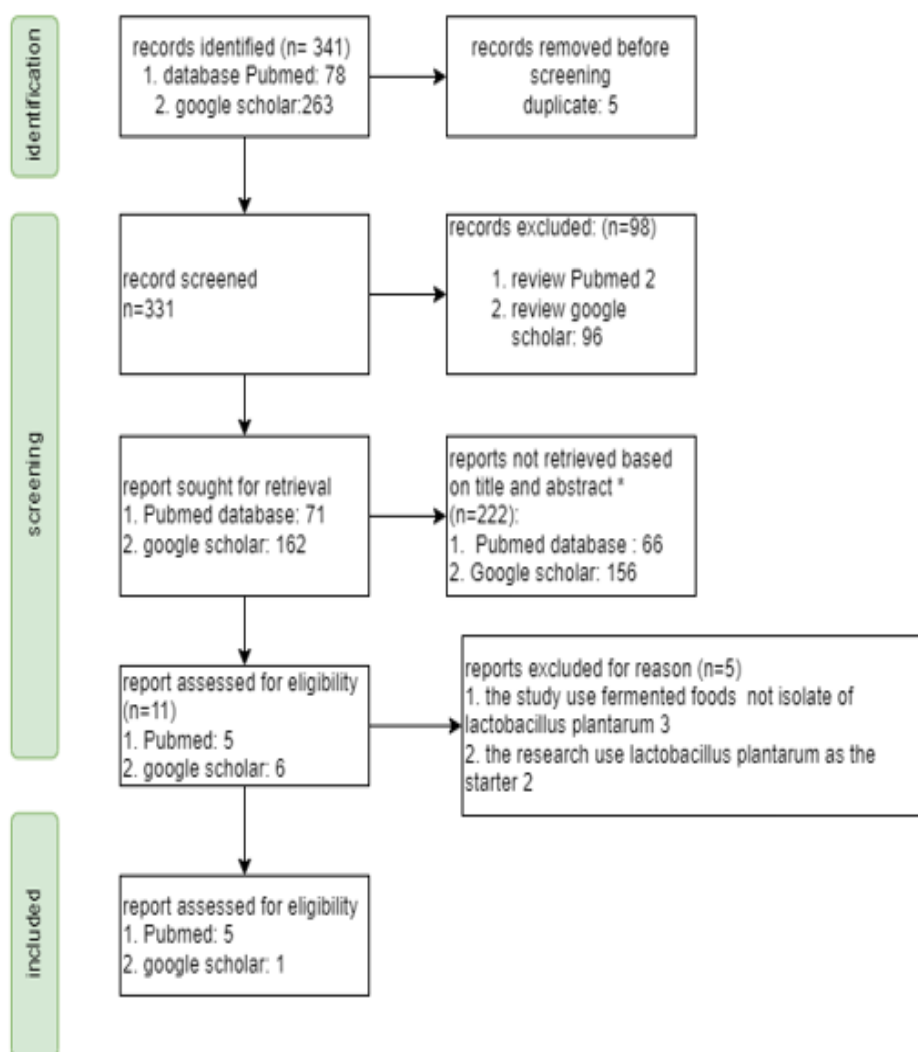
	Chao	ACE	Shannon	Simpson	Inv.simpson	fisher
--	------	-----	---------	---------	-------------	--------

Control	1666,53 ±73,19	1705,01 ± 23,12	3,68	0,895	9,57	208,03
fermentation	148,1± 26,84	135,86± 5,77	2,07	0,79	4,66	13,75

Gambar 3.7 Komparasi dari keberagaman taksonomi, biodiversitas dari hasil NGS antara kelompok nonfermentasi dengan fermentasi dari sambal lalapan

3.7 Diagram Prisma Eksplorasi *L. Plantarum* sebagai kandidat agen pencegahan PJK

Hasil dari NGS didapatkan bahwa *Lactiplantibacillus plantarum* menempati 48% spesies yang ditemukan di Fermentasi Sambal Lalapan. Diagram PRISMA terdiri dari 3 tahap yaitu identifikasi, skrining, yang terpilih dengan rangkaian proses di dalamnya sesuai dengan table dibawah ini. Dari hasil seleksi artikel didapatkan 6 jurnal yang eligible untuk dilakukan proses review sistematis.



Gambar 3.8 Diagram PRISMA alur seleksi artikel review sistematik terkait peran *Lactiplantibacillus plantarum* dalam inhibisi aterosklerosis

1	(4 1)	Clinical trial Lactobacillus plantarum 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men with Stable Coronary Artery Disease	drink containing Lp299v (20 billion CFU) once daily for 6 weeks	Twenty-one men (ages 40 –75 years) with stable coronary artery disease as diagnosed by coronary angiography	<ol style="list-style-type: none"> 1. Blood pressure and heart rate 2. Anthropometrics (height, weight, and waist circumference) 3. total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, serum glucose, and hemoglobin A1C); 4. inflammatory cytokines; 5. circulating adipokines 6. circulating adhesion molecules 7. TMAO, short chain fatty acids 8. metabolomic analyses. Biomarkers were measured at baseline and the end of the probiotic intervention phase only. 9. Stool samples were collected pre- and post-probiotic therapy for microbiome analysis. 10. Endothelial function as measured by brachial 	brachial FMD% ↑
---	----------	---	--	--	--	--------------------

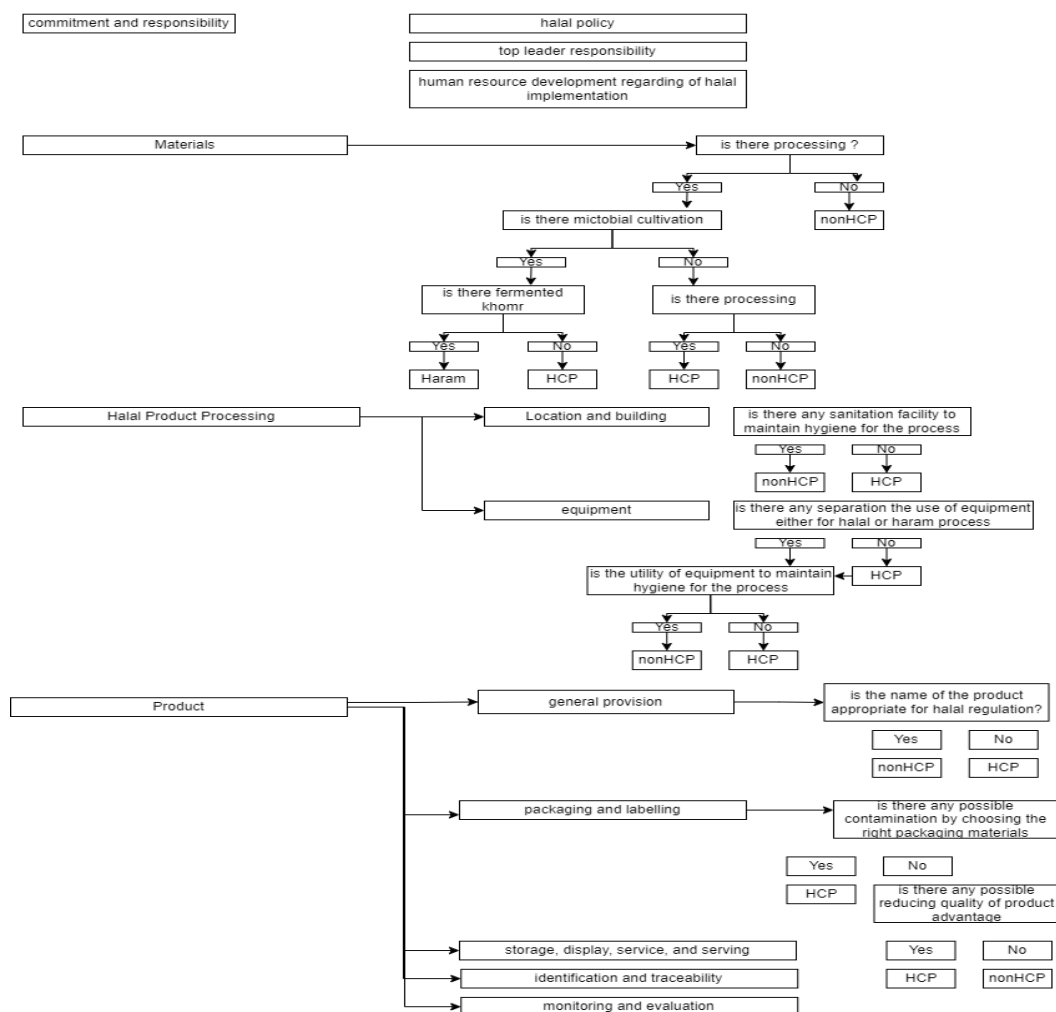
					artery reactivity was measured at baseline as well as at the end of the probiotic intervention	
2	(4 2)	Clinical trial Lactobacillus plantarum 299v probiotic supplementation in men with stable coronary artery disease suppresses systemic inflammation	Lp299v supplementat ion`	Study subjects (n = 15) were all men with an average age of 63 ± 7 years. Medical therapies: aspirin (86%), beta blocker (73%), ezetimibe (6.7%), fibrate (6.7%), HMG-CoA Reductase Inhibitor (86.7%), P2Y12 inhibitor (40%), niacin (6.7%), and 3ranolazine (6.7%).	11. Assessment of ex vivo human arteriolar endothelium-dependent vasodilation by videomicroscopy Physical measurements 1. Systolic blood pressure 2. Diastolic blood pressure 3. Body mass index 4. Plasma biomarkers 5. Fasting glucose 6. Total cholesterol 7. HDL 8. LDL 9. Triglycerides 10. Leptin Short chain fatty acids 1. Propionic acid 2. Butyric acid 3. Acetic acid Vascular function measurements 1. Resting brachial diameter	brachial flow mediated dilation (FMD) ↑ IL-12 ↓

					2. Peak hyperemic shear 3. Nitroglycerin-mediated	
3	(43)	In vivo Anti-atherosclerotic effects of Lactobacillus plantarum ATCC 14917 in ApoE ^{-/-} mice through modulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress	Lactobacillus plantarum ATCC 14917 per day for 12 weeks 0.2 mL (10 ⁹ CFU)	8-week-old atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient (ApoE ^{-/-}) mice	atherosclerotic lesions in the aorta serum lipids TNF α . IL1 serum oxLDL, MDA and SOD levels	atherosclerotic lesion formation inhibited oxLDL, MDA, TNF α and IL-1 β levels \downarrow \downarrow IkB α inhibited the translocation of P65/ NF- κ B
4	(44)	In vivo and in vitro study The Lab4P Consortium of Probiotics Attenuates Atherosclerosis in LDL Receptor Deficient Mice Fed a High Fat Diet and Causes Plaque Stabilization by Inhibiting Inflammation and Several Pro-Atherogenic Processes	Lab4P 5 \times 10 ⁸ colony forming units (CFU)/mouse/day; 100 billion CFU/day equivalent human dose) for 12 weeks	male LDLr ^{-/-} mice (8-week-old) fed HFD [21% w/w pork lard and 0.15% w/w cholesterol supplemented with THP-1 monocytes were cultured and differentiated into macrophages	Cell viability Cell proliferation, monocyte chemotactic protein (MCP)-1-driven monocytic migration uptake of DiI-labeled oxidized LDL (oxLDL), macropinocytosis radioactive-based cholesterol efflux from foam cells The levels of ROS in cells in vitro phagocytosis HASMC migration	\downarrow LDL/VLDL \uparrow HDL \downarrow LDL/VLDL:HDL (TC):HDL \uparrow TC:LDL/VLDL ratio \downarrow % plaque content \downarrow percentage occlusion \downarrow plaque lipid content \downarrow plaque macrophage \uparrow I α -smooth muscle cell actin (α SMA) staining, indicative of plaque stabilization \downarrow proliferation of THP-1 macrophages without decreasing cell viability

						<p>↓ Uptake of Dil-labeled oxLDL ↑ cholesterol efflux ↓ macropinocytosis ↑ phagocytosis ↓ CD36 mRNA expression ↑ ABCA1, LXRα MIGRATION ATTENUATED</p>
5	(4 5)	<p>In vivo and in vitro study Modulation of anti-inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 cell line and mouse model at gene expression level with indigenous putative probiotic lactobacilli</p>	<p>Lactobacillus plantarum Lp91 1x10⁹ colony forming unit (cfu)/ml</p>	<p>THP-1 derived macrophage +LPS 100ng/ml</p> <p>32 adult male (7–8 weeks old) Swiss Albino mice weighing 25–30 g + Normal diet + LPS</p>	<p>TNFα IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin</p>	<p>↓ TNFα, IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin</p>
6	(4 6)	<p>Alleviation of LPS-Induced Inflammation and Septic Shock by Lactiplantibacillus plantarum K8 Lysates</p>	<p>10¹¹ colony-forming units (CFUs)/mL</p>	<p>THP-1 derived macrophage +LPS 100ng/ml</p> <p>Male BALB/c mice (seven-weeks-old, n=4/group, Narabiotech, Seoul, Korea) were used for experiments. Endotoxin shock was</p>	<p>TNFα Phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear factor (NF)-κB negative regulator of TLR4 signaling SOCS1, A20</p>	<p>↓ TNFα ↓ Phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) ↓ Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear factor (NF)-κB ↑ negative regulator of TLR4</p>

				induced by IP injection of LPS in PBS. In some experiments, mice were injected with various concentrations of LPS (10 to 40 mg/kg)		signaling SOCS1, A20
--	--	--	--	--	--	----------------------

3.8 Penetapan titik kritis halal produk fermentasi sambal lalapan



BAB 4. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

1. karakteristik fisikokimia dari Fermentasi Sambal Lalapan (FSL) yaitu pH berkisar antara 3-4
2. Penerimaan produk makanan Fermentasi Sambal Lalapan di masyarakat berdasar hasil uji organoleptik rerata agak tidak suka.
3. Profil mikroba dari Fermentasi Sambal Lalapan Sebagian besar adalah pada filum Firmicutes, kelas Lactobacillaceae, dengan 3 spesies utama *Lactiplantibacillus plantarum*, *Weissella* dan *Leuconostococcus*.
4. Berdasar hasil pewarnaan gram didapatkan warna ungu, biokimi uji katalase negative mengindikasikan adanya bakteri asam laktat
5. Terdapat beberapa titik kritis halal pada proses Penetapan Produk Fermentasi mulai dari identifikasi Pemilik Usaha, Proses pemilihan bahan, Proses fermentasi, Penamaan Produk dan Pengemasan Produk.

4.2 Saran

1. Perlu adanya optimasi resep produk fermentasi sambal lalapan
2. Pengembangan produk dan ekstrak untuk penelitian selanjutnya

DAFTAR PUSTAKA

1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association [Internet]. Vol. 139, *Circulation*. 2019. 56–528 p. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000659>
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update : A report from the American Heart Association. Vol. 131, *Circulation*. 2015. 29–39 p.
3. Thakur Pran Krishna, Panja Payel, Kabir Jahangir. Effect of Temperature on Fermentation and Quality of Sauerkraut. Article in *Indian Journal of Ecology* [Internet]. 2017;(44):494–6. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/319547291>
4. Gelbenegger G, Postula M, Pecen L, Halvorsen S, Lesiak M, Schoergenhofer C, et al. Aspirin for primary prevention of cardiovascular disease: A meta-analysis with a particular focus on subgroups. *BMC Medicine* [Internet]. 2019;17(1):1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31679516/>
5. Newman CB, Preiss D, Tobert JA, Jacobson TA, Page RL, Goldstein LB, et al. Statin Safety and Associated Adverse Events A Scientific Statement from the American Heart Association. Vol. 39, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2019. 38–81 p.
6. Harmayani E, Anal AK, Wichienchot S, Bhat R, Gardjito M, Santoso U, et al. Healthy food traditions of Asia: Exploratory case studies from Indonesia, Thailand, Malaysia, and Nepal. *Journal of Ethnic Foods*. 2019;6(1):1–18.
7. Agarwal KC. Therapeutic Actions of Garlic Constituents. *Medicinal Research Reviews*. 1996;16(1):111–24.
8. Rachmawati E, Muhammad RF. The ethanolic extract of holy basil leaves (*Ocimum sanctum* L.) attenuates atherosclerosis in high fat diet fed rabbit. *AIP Conference Proceedings*. 2021;2353(May).
9. Chaudhary P, Sharma A, Singh B, Nagpal AK. Bioactivities of phytochemicals present in tomato. *Journal of Food Science and Technology* [Internet]. 2018;55(8):2833–49. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3221-z>
10. Palermo M, Pellegrini N, Fogliano V. The effect of cooking on the phytochemical content of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(6):1057–70.
11. Viridiana C-R, Lidia D-A, Audry P-L, Humberto H-S. Lactic Acid Bacteria Isolated From Vegetable Fermentations: Probiotic Characteristics. *Reference Module in Food Science*. 2018;1–6.
12. Patra JK, Das G, Paramithiotis S, Shin HS. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: A review. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(SEP):1–15.

13. Gorski PA, Ceholski DK, Hajjar RJ. Altered myocardial calcium cycling and energetics in heart failure - A rational approach for disease treatment. *Cell Metabolism* [Internet]. 2015;21(2):183–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.005>
14. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 SUPPL.).
15. Michael A. GJ, Guillermo G-C. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circulation Research*. 2016;176(1):139–48.

LAMPIRAN 1. FORMULIR EVALUASI ATAS CAPAIAN LUARAN KEGIATAN

Peneliti Utama : Dr. Suharti, S.Pd., M.Si
 Perguruan Tinggi : Universitas Negeri Malang
 Judul : Inovasi Pengembangan Produk Halal Berbasis Budaya Lokal Ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan Sebagai Terapi Suportif dalam Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Kardiovaskuler
 Tahun Kegiatan : 2022

Luaran yang direncanakan dan capaian tertulis dalam proposal awal:

No	Luaran yang Direncanakan	Capaian (%)
1	Publikasi jurnal internasional minimal Q2	70%
2	Publikasi ilmiah internasional terindeks Scopus	70%
3	Keterlibatan peneliti ke-4 PT pada publikasi	70%
4	Publikasi media massa	100%

1. PUBLIKASI JURNAL ILMIAH INTERNASIONAL

	ARTIKEL JURNAL KE-1	Keterangan
	Nama Jurnal yang dituju	International Journal of Food Sciences and Nutrition
	Klasifikasi Jurnal	Jurnal internasional Q2 terindeks scopus
	Judul artikel	Microbiological, biochemical dan organoleptic properties of Indonesian Sambal Lalapan Fermentation And Potential Advantages On Coronary Heart Disease Prevention
	Status naskah	
	<ul style="list-style-type: none"> - Draft artikel - Submitted - Under review - Accepted - Published 	v
	ARTIKEL JURNAL KE-2	
	Nama Jurnal yang dituju	International Journal of Food Sciences and Nutrition
	Klasifikasi Jurnal	Jurnal internasional Q2 terindeks scopus
	Judul artikel	Developing control poins for Halal for fermentation product in small industrial scale

	Status Naskah	
	<ul style="list-style-type: none"> - Draft artikel - Submitted - Under review - Accepted - Published 	v
	ARTIKEL JURNAL K-3	
	Nama Jurnal yang dituju	
	Klasifikasi Jurnal	Jurnal Internasional Q2 terindeks scopus
	Judul artikel	
	Judul artikel	Antioxidant capacity of Indonesian Sambal Lalapan Fermentation and its in silico prediction in atherosclerosis based disease

2. PEMBICARA PADA PERTEMUAN ILMIAH INTERNASIONAL / KEYNOTE SPEAKER

	Keterangan
Judul Makalah	-
Nama Pertemuan Ilmiah	-
Q1/Q2/ Terrine's Scopus	-
Tempat Pelaksanaan	-
Status Naskah (diberi tanda √) Type	-
Draf Artikel	-
Submitted	
Under Review	
Accepted	
Published	

Jika masih ada pertemuan ilmiah ke 2 dan seterusnya, uraikan pada lembar tambahan

3. KETERLIBATAN PENELITI KE-4 PT PADA PUBLIKASI

ARTIKEL ILMIAH 1	<p>UM : sebagai peneliti utama yang lebih banyak menulis manuskrip artikel.</p> <p>UB : penulisan mengenai hubungan produk fermentasi sambal lalapan dengan penyakit jantung koroner</p> <p>UNAIR : penulisan mengenai bahan aktif yang berhubungan dengan penyakit jantung koroner</p>
ARTIKEL ILMIAH 2	<p>UM : label halal produk fermentasi</p> <p>UB : produk halal untuk penyakit jantung koroner</p> <p>UNAIR : pembuktian bahan aktif yang terdapat pada FSL sebagai produk makan thayyib</p>
ARTIKEL ILMIAH 3	<p>UM : peranan kandungan mikroba FSL untuk penyakit jantung koroner</p> <p>UB: Pembuktian ekstrak fSL pada hewan coba yang diberikan diet tinggi lemak</p> <p>UNAIR : Bahan aktif yang terdapat pada FSL untuk penyakit jantung koroner</p>

Jika luaran yang direncanakan tidak tercapai, uraikan alasannya:

.....
.....

Kota, Tanggal-Bulan-Tahun
Peneliti Utama,



(Dr. Suharti, S.Pd., M.Si)
NIP. 19670417199203 2 009

Lampiran 2. Format Ringkasan Laporan Kemajuan Program Riset Kolaborasi Indonesia 2022

Mohon diisi oleh masing – masing Peneliti Utama dan Anggota Peneliti Mitra.

Judul Riset	Inovasi Pengembangan Produk Halal Berbasis Budaya Lokal Ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan Sebagai Terapi Suportif dalam Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Kardiovaskuler
Program	Program Riset Kolaborasi Indonesia- 2022
Peneliti Utama	Dr. Suharti, S.Pd., M.Si (UM)
Peneliti Mitra	<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. Dr. dr. Djanggan Sargowo, SpJP, SpPD (UB) 2. Prof. Dr. dr. Yudi Her Octaviano, SpJP (UNAIR) 3. Dr. Ahmad Munjin Nasih, S.Pd, M.Ag (UM)
Unit Pengusul	
Target Capaian	Target capaian yaitu metode optimasi fermentasi dan ekstraksi sambal lalapan dan prediksi aktivitas anti aterosklerosis dari senyawa aktif dan hasil fermentasi ekstrak fermentasi sambal lalapan. Target riset telah tercapai 70% sampai dan submit manuskrip pertama akan dilaksanakan pada bulan Agustus
Hasil yang sudah diperoleh	<p>Hasil capaian Riset</p> <ul style="list-style-type: none"> - Produk Fermentasi Sambal Lalapan - Pembuatan ektsrak fermentasi sambal lalapan - Pemeriksaan dan terdapat hasil pemeriksaan Bakteri Asam Laktat pada produk Fermentasoi Sambal Lalapan menggunakan metode Isolasi BAL dan NGS - Squensing gen dengan PCR - Uji organoleptik produk fermentasi Sambal Lalapan
Prosentase	70%
Manajemen Riset Kolaborasi	<p>Peneliti utama dan pihak mitra membentuk Whatshap grup untuk mempermudah update progress dan koordinasi. Selain itu koordinasi dilakukan melalui daring maupun luring minimal 1x dalam setiap bulannya untuk sharing terkait progres penelitian.</p> <p>Saat penelitian dilakukan di UM, pihak mitra melakukan kunjungan ke UM untuk diskusi terkait penelitian yang sedang dilaksnakan Ketua riset juga melakukan kunjungan ke pihak mitra UB dan UNAIR untuk diskusi mengenai persiapan penelitian yang akan dilakukan. Penggunaan Laboratorium secara sharing.</p>

Pendanaan	<p>Jelaskan secara singkat hambatan kegiatan riset yang terkait dengan administrasi keuangan (Jika ada).</p> <ul style="list-style-type: none"> - Di UB keterlambatan pencairan dana dan hal ini menyebabkan proses pemesanan kit tertunda padahal dari proses pemesanan sampai datangnya kit memerlukan waktu serta berakibat mengganggu waktu kecepatan kerja di laboratorium
Kelanjutan riset	<p>Agustus – Oktober</p> <ul style="list-style-type: none"> - Uji kandungan senyawa aktif pada produk fermentasi sambal lalapan (UNAIR) - Uji In Vitro (UNAIR) - Uji In Vivo pada kelinci (UB) <p>Agustus : Submit manuskrip 1 September : Submit manuskrip 2 Oktober : Submit manuskrip 3</p>
Hambatan dan kesulitan	<ul style="list-style-type: none"> - Pengukuran parameter di laboratorium antri - Kedatangan kit yang kurang sesuai dengan target waktu - Deadline waktu singkat dengan target output publikasi yang tinggi yaitu jurnal Q1 dan Q2

Lampiran 3. Draft Manuskrip 1 RKI

MICROBIAL PROFILING OF INDONESIAN SAMBAL LALAPAN FERMENTATION AND POTENTIAL ADVANTAGES ON CORONARY HEART DISEASE PREVENTION

Suharti Ismail¹, Ermin Rachmawati^{2*}, Djanggan Sargowo⁴, Yudi Her Octaviano⁵, Munjin Nasih³, Larasati Sekar Kinasih², Makhyan Jibril⁶

¹ Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Malang, East Java, Indonesia

² Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, East Java, Indonesia

³ Department of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, East Java Indonesia

⁴ Department of

⁵ Department of Cardiology and Vascular Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

⁶ Department of Cardiology and Vascular Medicine, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

ABSTRACT

Keywords: sambal lalapan, fermentation, cardiovascular,

1. Introduction

Coronary heart disease (CHD) remains as the first cause of deaths worldwide(1). In addition, the prevalence of CHD as the most prevalent type of cardiovascular illness is rising globally(1,2). This disease produces immense health and economic burdens worldwide(3,4). Epidemiological data showed the relation between dietary food and lower risk of CHD. One prospective study demonstrated that diet rich of plant foods have an inverse relationship with CHD risk(5,6).

Sambal lalapan is a combination between vegetable and Indonesian home-made sauce that widely found in Indonesia(7,8). The vegetables consist of cucumber, cabbage, and basil leave. Whereas, The Indonesian sauce ingredients are onion, garlic, chilli, and tomato that are mixed together with hands and traditional equipment called cobek. Experimental studies indicate the antioxidant and anti-inflammatory properties of secondary metabolite of the ingredients.

Although the ingredients are healthy, but not with the processing step that are mainly fried with high temperature. Moreover, the raw vegetable exposed to air would be easily oxidized and get contamination. Thus, the innovation of sambal and vegetable processing in making the sambal lalapan is highly recommended. Fermentation is a valuable biotechnological process that can maintain and improve the safety, nutritional, sensory, and shelf-life properties of vegetables(9). Numerous studies suggest that the potential benefit following the consumption of fermented dairy products containing viable lactic acid bacteria. Most probiotics fall into the group of organisms' known as lactic acid-producing bacteria and are normally consumed in the form of yogurt, fermented milks or other fermented foods. Some of the beneficial effect of lactic acid bacteria consumption include: (i) improving intestinal tract health; (ii) enhancing the immune system, synthesizing and enhancing the bioavailability of nutrients. The mechanisms by which probiotics exert their effects are largely unknown, but may involve modifying gut pH, antagonizing pathogens through production of antimicrobial compounds, competing for pathogen binding and receptor sites as well as for available nutrients and growth factors,

stimulating immunomodulatory cells, and producing lactase. Several reports show that lactic acid bacteria also have benefit in the prevention of coronary heart disease.

There are still lack of study identify the microbe and investigate the benefit of vegetable and in sambal lalapan fermentation to prevent CHD. Detection of foodborne pathogens to provide safe food supply and to prevent foodborne diseases is an emerge issues in food industry and public health field nowadays(10). Therefore, the recent study aimed to compare microbial profiling inside the sambal lalapan and its fermentation. Additionally, the literature review of the use of probiotic in atherosclerosis inhibition as the etiology of coronary heart disease also explored.

2. *Material and method*

2.1 *Sambal Lalapan fermentation process*

Sambal ingredients consist of onion, garlic, chilli, and tomato; Lalapan vegetables were white cabbage, basil leaves, and cucumber were collected from traditional market. The morphological characteristics and agronomic traits of 'all plant material Cucumber were determined and described from *Materia Medica-Indonesian Government*. The weight of sambal, lalapan ingredients, and The recipe of sambal was adjusted with Indonesian local formula as follow: (1) 5 g onion; (2) 5 g garlic; (3) 10 g chilli; (4) 50 g tomatoes; (5) 100 g white cabbage; (6) 95 g cucumber(11–15).

Fresh cabbage was cleaned, dried, weighted, shredded, and mixed with 3% salt overnight in 4°C. Fresh cucumber was peeled, cut into small pieces and weighted. Selection of basil leaves, followed by clean in fresh water, dried, weighted, and cut into smaller size. After onion, garlic, chili and tomato were sorted and washed with fresh water and dried, the ingredients were mixed together using mortar. Thus, the sugar, salt, vegetables were added into sambal and mixed together and mixed. The time for natural fermentation were 7, 14, 21 days(16). The fermentation jar was kept in 20°C(17).

2.2. **Physicochemical Measurements and sensory analysis**

2.2.1. *pH Measurements*

The fermentation process was monitored 0, 7th, 14th, 21st day by measuring the brine pH. The pH results were obtained using a Seven2Go S2-Basic portable pH meter (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) according to ISO10523:2008, and EC was measured with a FiveGo F3 portable conductivity meter (Mettler Toledo, Columbus, OH, USA) according to ISO7888:1985.

2.2.2 *Organoleptic study*

27 untrained panelist who studied in Medical Science Department evaluated the sensory quality of the Sambal Lalapan Fermentation samples (Sample Control, P1, P2 dan P3). The samples were evaluated for flavor, spiciness, sourness, texture, color, overall preference using 7-poin hedonic scale(1)(2) with 1) for dislike very much ; 2) for dislike moderatley; 3) for dislike slightly dislike; 4) neither like nor dislike; 5) like slightly; 6) like moderately; 7) like very much(18–20).

2.3 *BAL identification genotype and phenotype*

2.3.1 *BAL morphological and biochemical test*

Fermented Samples (10 g) were homogenized in 90 mL sterile 0.9% (*m/V*) NaCl, diluted and plated at 37 °C for 48 h on MRSA agar with glacial acetic acid; Oxoid, Basingstoke, UK selective for lactobacilli using pour plate technique. After 48 hours, Colonies were observed and selected by their different morphology and texture and transferred to another plated using streak plate method to obtained single isolated colony(21).

Gram-positive, catalase-negative were selected for phenotype characterization. Colonies of lactobacilli formed on MRS were examined for Gram staining using Gram staining kit (SKU-Pack Size, SIGMA ALDRICH, USA). The color and morphology were observed under light microscopy (LABOMED, USA) using oil immersion. The catalase activity test was performed by drop 3% H₂O₂ into the isolated colony in coverslip(21). The absence of oxygen effervescence indicated the negative response.

The endospore formation was determined by protocol as follow: (1) aseptically smear of lactobacilli on a slide using heat fixed; (2) applied Malachite green (the principal stain) into the slides that were placed on a boiling water bath; (3) rinsed with water; (4) add The counter stain (safranin) was applied on slide for 20 s and rinsed with water again and the slides were blot dried then observed under the light microscope (LABOMED, USA). Red coloured (non-spore forming) isolates were kept and subjected to further test(22)s.

2.3.2 Identification of BAL genotype

Genomic DNA extraction from raw samples were carried out using ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, D4300)(24) DNA concentration was determined using both NanoDrop spectrophotometers DNA was extracted from single isolated colony from 7, 14, 21 days of fermentation followed by amplification of the bacterial 16S rRNA using a two-step PCR procedure using primers 515F(5'-ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTGCC AGCMGCCGCGGTAA-3') and 806 R(5'-GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'), whereas eight forward and two reverse primers were used in the second step. PCR amplification was performed in a final volume of 50 µL, containing 10 mM TrisHCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 100 nM forward primer, 100 nM reverse primer, 25 ng template DNA, and 0.5 U TaKaRa Taq DNA polymerase (TaKaRa Bio, Japan). Amplification was performed using the GeneAmp PCR System 9700 Thermal Cycler (Life Technologies, USA). The following parameters were used for amplification: 94 °C for 5 min, followed by 25 cycles of 95 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and finally 72 °C for 4 min. The method by Lee et al (23)was ued for run electrophorese of The PCR product in agarose gel.

2.4 Determination of pathogenicity

Detection of food borne pathogen was a critical step in ensuring the food safety. Thus, this study also determined the possible pathogen in fermentation food which was carried out through hemolytic test. Hemolytic tests are carried out by inoculating bacterial cultures in blood agar media supplemented with human whole blood (5%) and incubated at 37°C for 48 hours. The presence of hemolytic activity was characterized by the presence of a hemolytic zone in the blood agar medium. Hemolytic test results are grouped into 3 groups, namely hemolytic- α (formed green zone around bacterial colonies), hemolytic- β (formed clear zones around bacterial colonies), or hemolytic- γ (no clear zones around bacterial colonies) in the blood agar. Pathogenic bacteria are characterized by a reaction that occurs between bacteria that grow with blood agar media. Formation of clear zones around the growing bacterial colonies indicate the pathogenic bacteria, whereas no clear zones around the bacterial colonies are formed in the results of non-pathogenic bacteria test.

2.5 Microbial profiling of Sambal Lalapan Fermentation by NGS

After performing manual method to identify the microorganism which was grown in agar, this study also observed the microbiome profile inside the fermentation using NGS. Genomic DNA extraction from raw samples were carried out using Zymo BIOMICS DNA Miniprep Kit (Zymo Research, D4300)(24) DNA concentration was determined using both NanoDrop spectrophotometers and Qubit fluorometer. Library preparations were conducted using Kits from Oxford Nanopore Technology(25). Nanopore sequencing was operated by MinKNOW software version 22.05.7.

Basecalling was performed using Guppy version 6.1.5 with high-accuracy model(25). The quality of FASTQ files were visualized using NanoPlot, and quality filtering was performed using NanoFilt (26,27). Filtered reads were classified using Centrifuge classifier. Bacteria and Archaea index was built using NCBI 16S RefSeq database (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/TargetedLoci/>). Downstream analysis and visualizations were performed using Pavian (<https://github.com/fbreitwieser/pavian>), Krona Tools (<https://github.com/marbl/Krona>), and R Studio using R version 4.2.0 (<https://www.R-project.org/>)(28).

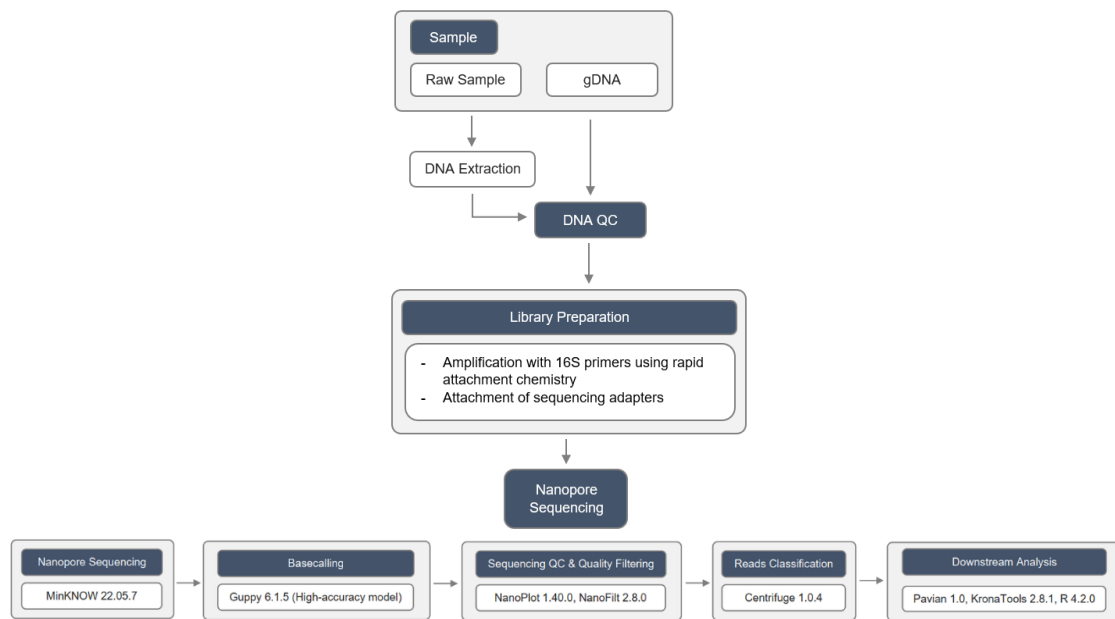


Figure 1. Experimental and bioinformatic workflow

2.6 Systematic review of probiotics function in prevention of CHD

To get comprehensive overview about the benefit of main species found in Indonesian fermentation sambal lalapan, we performed a systematic literature search in PubMed, and google scholar databases according to PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) guidelines(29) from 1st July up to 1st August 2022. Atherosclerosis is the cause of IHD which characterized by chronic inflammation, the accumulation of lipids and fibrous elements in the arteries(30). The progression of atherosclerosis can be determined by histological lesion view from early stage which is consist of foam cell, fatty streak; the intermediate stage (pre-atheroma, atheroma), and the advance lesion (fibrous and vulnerable plaque)(31–34). Therefore, an approach to develop product for IHD prevention by inhibiting the progression of early-stage atherosclerosis has become an emerging issue nowadays. Several stages important in foam cell establishment: (1) dyslipidemia; (2) endothelial dysfunction. Although there are several studies have been investigating the benefit the food fermentation on metabolic disorder, but there is still no report identify the potential target of this fermentation in foam cell inhibition. the secondary metabolite of probiotic the fermentation was then used to make prediction of its anti-atherosclerosis potential properties. Based on theoretical concept, we used several criterias as the inclusion and exclusion criteria. The inclusion criteria must include fermentation probiotic AND dyslipidemia endothelial dysfunction OR foam cell atherosclerosis. The exclusion criteria included the process Studies were considered for inclusion in the present systematic review if they met the following criteria: (1) the authors reported data from an original, peer-reviewed study. (2)not; (2) the in vitro or in vivo design; (3) the treatment is probiotic in food fermentation; (4)

outcome is clear as follows dyslipidemia or endothelial dysfunction or foam cell related to atherosclerosis; (4) the model was clear either the mice model of atherosclerosis or co culture of endothel and macrophage exposed to oxLDL. Exclusion criteria were reviews, conferences, and letters; the food fermentation which is not include the role of probiotic.

2.7 Statistical analysis

Statistical analysis for pH, organoleptic comparison among groups was performed in SPSS version 24.0 by using ANOVA or Kruskal–Wallis test, where appropriate. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1 Indonesian sambal lalapan appearance after spontaneous fermentation

Sambal Lalapan is a traditional Indonesian dish that served regularly. In order to increase its health benefits, this research made a breakthrough by changing the processing using fermentation technique. benefit of this cuisine. Indonesian sambal lalapan was prepared from main ingredient cabbage and cucumber. After salting the cabbage overnight, additional ingredients were added the next day and mixed with seasonings such as onion, garlic, basil leaves, tomato, chilli, salt and sugar. The fermentation was set at constant temperature 20°C in 3 different time 7, 14, 21 days. The step of spontaneous fermentation and general look after natural fermentation was depicted in Fig. 2.

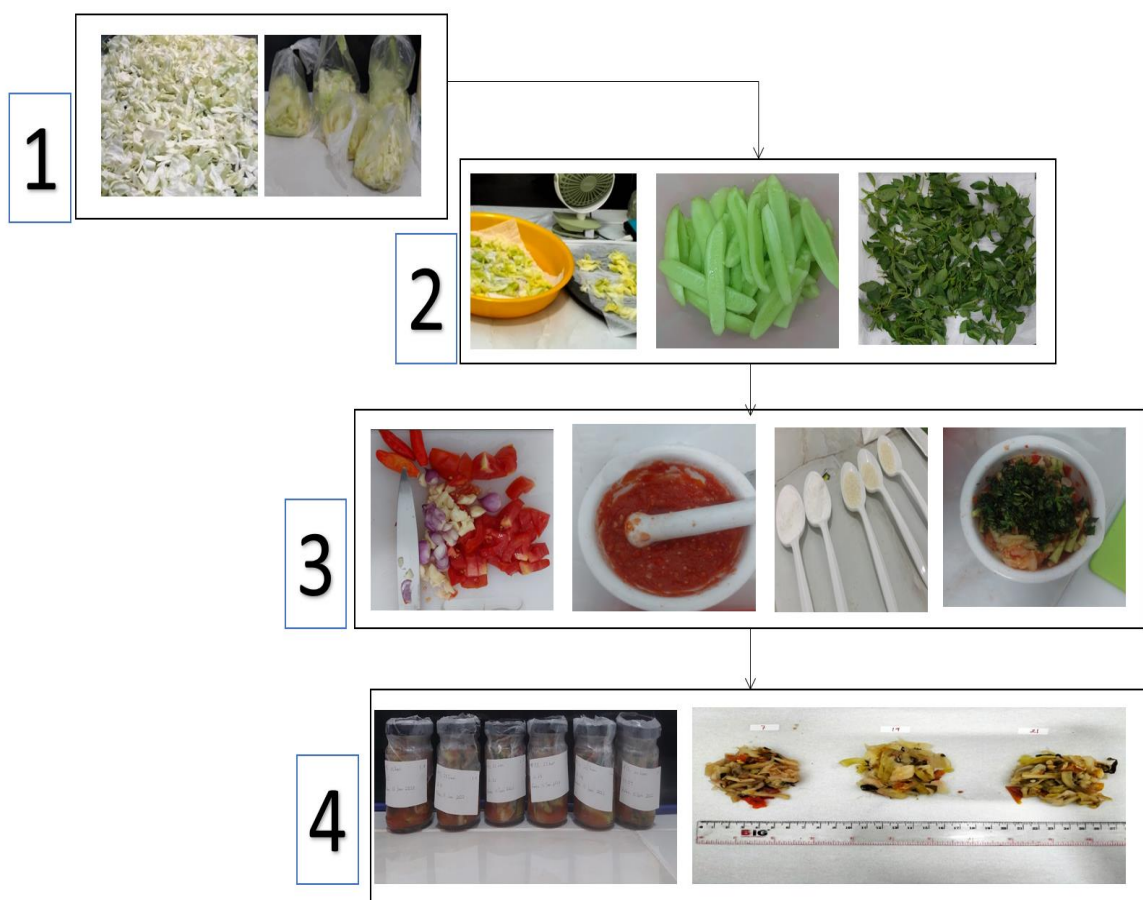


Figure 2. The steps and appearance of sambal lalapan fermentation. Overall, the color of ingredients after fermentation was more brown compare with the control group (0 days).

3.2 pH of Sambal Lalapan Fermentation

There was gradual reduction of pH after the food fermented 7,14, 21 days respectively. Stated in the research that the best pH for adequate fermentation range between 3 and 4. According to this, we concluded that 14th and 21st days fermentation showed the optimum fermentation time (Table1).

Table 1. pH of naturally fermented sambal lalapan.

Group	pH
C	4.726 ± 0.26#^
P1	4.358 ± 0.7453*^
P2	3,678± 0.06127*#
P3	3,3780± 0,04067*#^

Data are presented as mean ± SE.

C=mixed vegetable; P1, P2, P3= fermented mixed vegetable 7,14, 21 days, respectively

* Significant difference with control group (P<0.05)

#Significant difference with P1 group (P<0.05)

^ Significant difference with P2 group(P<0.05)

3.2 Organoleptic study

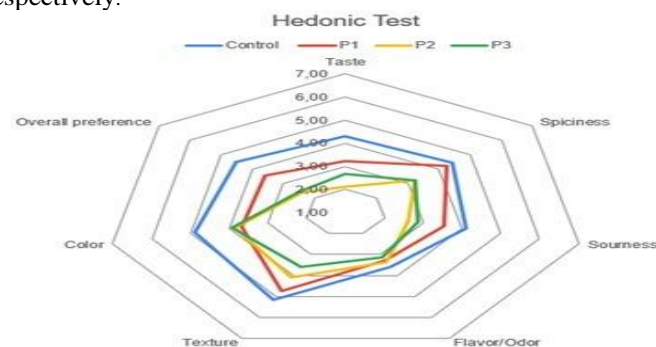
Organoleptic tests are widely used to assess the quality of the food industry and other agricultural products based on customer preference. Organoleptic results are shown in Table 2.

Table 2. Organoleptic properties of fermented-mixed vegetables sambal lalapan product at different test days.

	Flavor	Spicy	Sour	Aroma	Texture	Color	overall
c	4,30 ± 1,27	4,44±1,15	4,11±1,05	3,59±1,42	5.19±1.08	4,89±1.05	4.52±1.25
P1	3,22 ± 1,58*	4,25±1,16	3.52±0.98*	3,30±1,38	4.74±1.26	3,67±1.14*	3.48±1.39*
P2	2,11 ± 1,09*#	3,22±1,48*#	2.63±1.67*#	3,37±1,67	4.11±1.60*	3,85±1.51*	2.41±1.08*#
P3	2,67 ± 1,74*	3,25±1,65*#	2.85±1.88*#	3,15±1,72	3.59±1.37*#	3,93±1.63*	2.48±1.72*#

Data are presented as mean ± SE. =mixed vegetable; P1, P2, P3= fermented mixed vegetable 7,14, 21 days, respectively.

*# different superscript symbols showed significant difference (p < 0.05) between days 0, 7, 14 and 21, respectively.



The overall acceptance of product by customer showed highest score in non-fermented mixed vegetables. In addition, the score of 7 aspects of hedonic test also showed highest in control group compare to other groups. It can be concluded that the customer slightly like the non-fermented product. The 7th days fermentation got the highest score of acceptance compare to another group. Sambal lalapan fermentation 7 days gave high score for its texture, sourness, spiciness, and flavor.

3.3 Lactic acid bacteria identification

The decrease of pH in food fermentation can be explained by the presence of lactic acid bacteria. For the identification and classification of LAB, which include conventional morphology description by staining and biochemical tests such as catalase activity test. Figure showed the steps of BAL isolation and the morphological biochemical test.

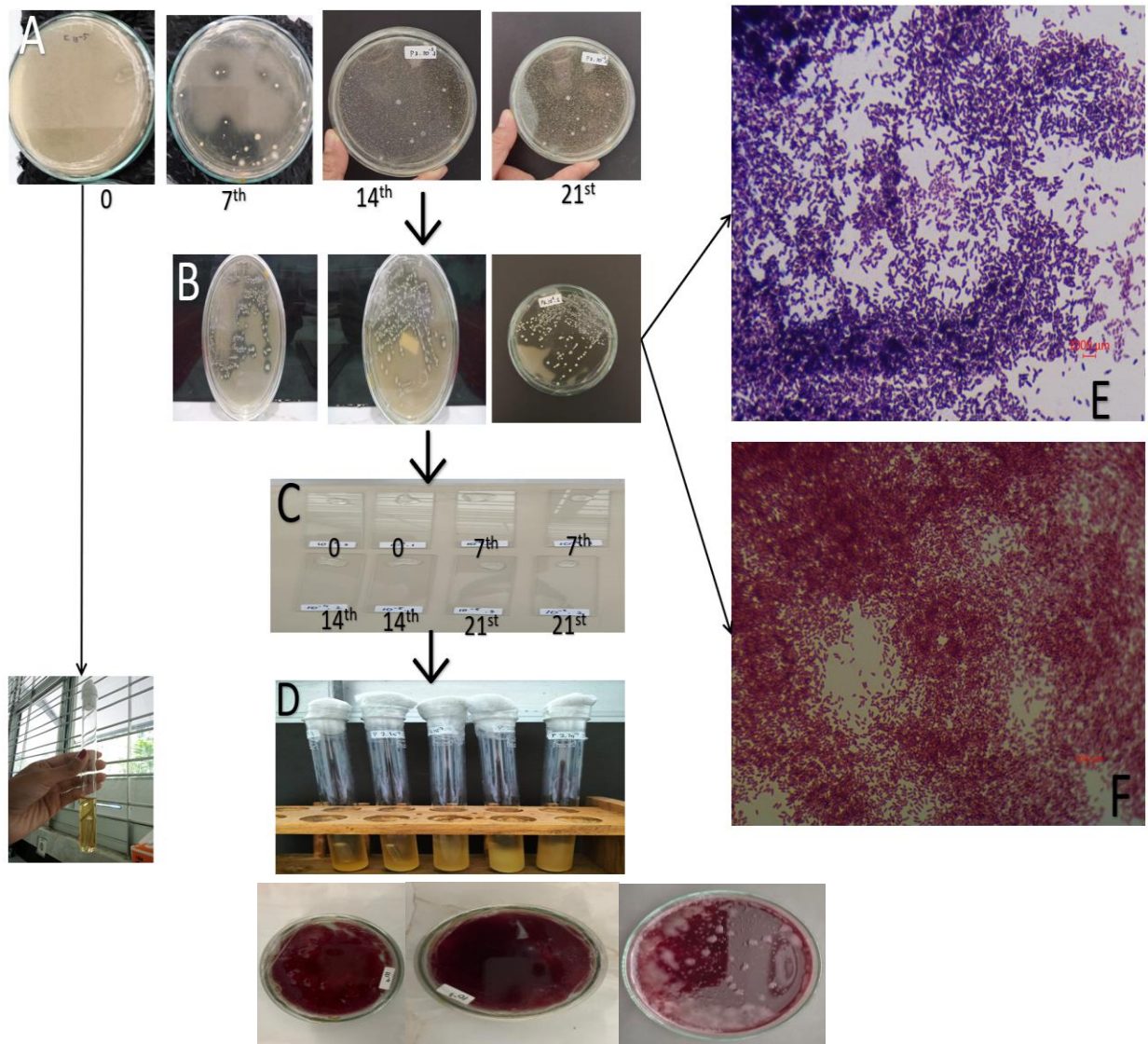


Figure 3. steps of Single colony isolation, its morphology, the result of biochemistry and pathogenicity test. A light microscope was used to observe the isolated microorganisms.

It is evident that the bacteria was a rod-shaped, gram-positive coccobacillus that could exist single or in chains. The findings of the gram staining revealed that lactobacilli could be recognized in the isolated bacteria. The isolated bacteria were observed by light microscope. It is clear that the bacteria was gram positive, rod shaped coccobacilli, occurring singly or in chains. The gram staining results indicated that the isolated bacteria could be identified as lactobacilli.

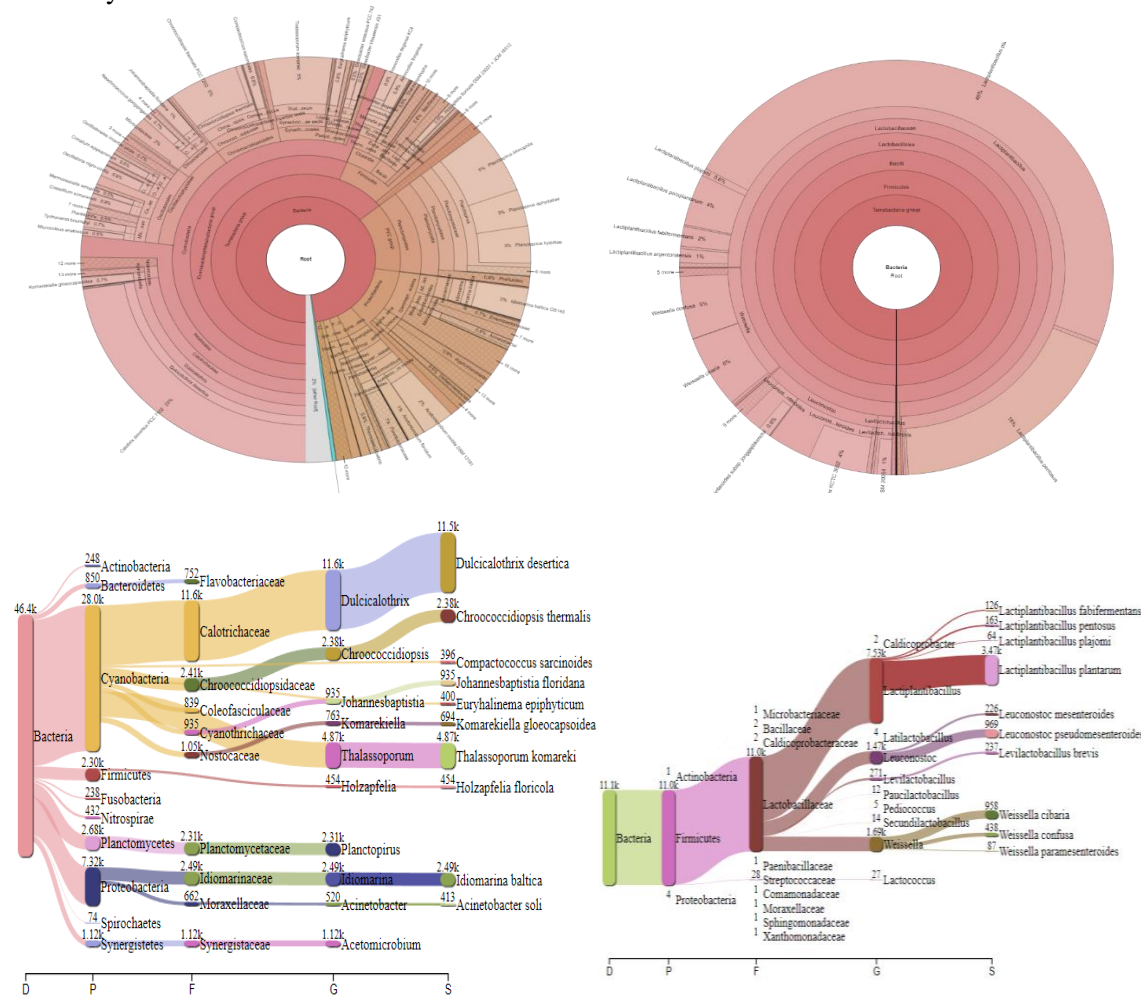
Due to its simplicity, the catalase test is one of the most effective diagnostic procedures for identifying bacteria. No bubble was seen during the catalase test, showing that the isolated bacteria is catalase negative and cannot mediate the breakdown of H_2O_2 to create O_2 . The fact that *Lactobacillus*

acidophilus is catalase negative is widely recognized. Foodborne pathogens are responsible for a wide range of illnesses with serious consequences for both human health and the economy(35)

3.4 Microbial profiling of Sambal Lalapan Fermentation by NGS

Nowadays, to food safety, early detection of food pathogen is an important program in the food industry(36). Hence, the fast detection method for microbe identification is urgently required. NGS techniques enable researchers to identify and categorize complex microbial communities without the need of cultures. These techniques can help speed up the identification of new species in microbiome samples and make it easier to find genes associated with virulence and antibiotic resistance(37).

Krona visualization allows us to intuitively explore the relative abundances within the complex hierarchies of metagenomic classifications. Sankey diagrams are used to visualize microbial species of samples. In this diagram, the arrow width is proportional to the quantity to depict changes over time hierarchy between nodes.



	Chao	ACE	Shannon	Simpson	Inv.simpson	fisher
Control	1666,53 ±73,19	1705,01 ± 23,12	3,68	0,895	9,57	208,03
fermentation	148,1± 26,84	135,86± 5,77	2,07	0,79	4,66	13,75

Figure 4. Comparative relative abundance (%) of taxa, species and also biodiversity in Indonesian sambal lalapan and 14th day sambal lalapan fermentation.

There are several phylum bacteria identified in control group, where the main was cyanobacteria. On the other hand, only small portion of phylum bacterial was found in fermentation group. The dominant phylum was firmicutes. The same pattern was observed in family, genus of bacteria inside the vegetables and seasoning in control group compared with the fermentation group. The number of species shown in control group was 1101 species, whereas in fermentation group was 92 species. Interestingly there were 10 bacteria found either in control or fermentation group. In addition, lactoplantibacillus plantarum (3.47k/48%) was the main species found in fermentation group, followed by leuconostococcus pseudomesenteroides (969), and weissella cibaria (958).

Biodiversity represents the variety and heterogeneity of organisms or traits at all levels of the hierarchy of life, from molecules to ecosystems(38). Alpha diversity describes the mean species diversity in a local scale either richness and evenness. Species richness is the number of species per unit area. Species evenness is the measure of number of individuals of a species(38,39). Control group has a higher Chao, ACE, Shannon, Simpson, Inv Simpson index, and fisher compared to fermentation group. It means that samples from fermentation group were shown to have similar microorganisms(38,40).

3.5 Prisma diagram for reviewing the potential advantages of *Lactiplantibacillus Plantarum* in the prevention of CHD

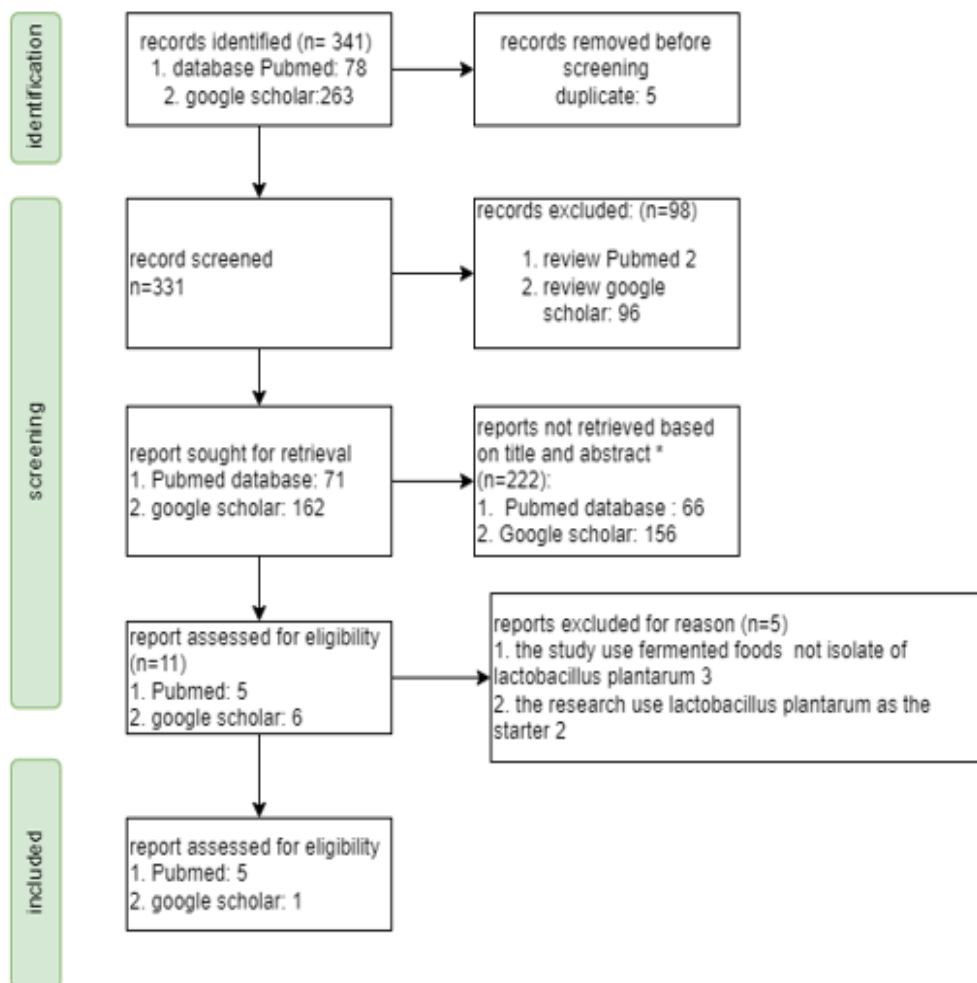


Figure 5. PRISMA flowchart

Hasil 6 artikel

1	(41)	<p>Clinical trial Lactobacillus plantarum 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men with Stable Coronary Artery Disease</p>	<p>drink containing Lp299v (20 billion CFU) once daily for 6 weeks</p>	<p>Twenty-one men (ages 40 – 75 years) with stable coronary artery disease as diagnosed by coronary angiography</p>	<p>12. Blood pressure and heart rate 13. Anthropometrics (height, weight, and waist circumference) 14. total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, serum glucose, and hemoglobin A1C); 15. inflammatory cytokines; 16. circulating adipokines 17. circulating adhesion molecules 18. TMAO, short chain fatty acids 19. metabolomic analyses. Biomarkers were measured at baseline and the end of the probiotic intervention phase only. 20. Stool samples were collected pre- and post-probiotic therapy for microbiome analysis. 21. Endothelial function as measured by brachial artery reactivity was measured at baseline as well as at the end of the probiotic intervention 22. Assessment of ex vivo human arteriolar endothelium-dependent</p>	<p>brachial FMD% ↑</p>
---	------	--	--	---	---	------------------------

					vasodilation by videomicroscopy	
2	(42)	Clinical trial Lactobacillus plantarum 299v probiotic supplementation in men with stable coronary artery disease suppresses systemic inflammation	Lp299v supplementation	Study subjects (n = 15) were all men with an average age of 63 ± 7 years. Medical therapies: aspirin (86%), beta blocker (73%), ezetimibe (6.7%), fibrate (6.7%), HMG-CoA Reductase Inhibitor (86.7%), P2Y12 inhibitor (40%), niacin (6.7%), and 3ranolazine (6.7%).	Physical measurements 11. Systolic blood pressure 12. Diastolic blood pressure 13. Body mass index 14. Plasma biomarkers 15. Fasting glucose 16. Total cholesterol 17. HDL 18. LDL 19. Triglycerides 20. Leptin Short chain fatty acids 1. Propionic acid 2. Butyric acid 3. Acetic acid Vascular function measurements 4. Resting brachial diameter 5. Peak hyperemic shear 6. Nitroglycerin-mediated	brachial flow mediated dilation (FMD) ↑ IL-12 ↓
3	(43)	In vivo Anti-atherosclerotic effects of Lactobacillus plantarum ATCC 14917 in ApoE -/- mice through modulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress	Lactobacillus plantarum ATCC 14917 per day for 12 weeks 0.2 mL (109 CFU)	8-week-old atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient (ApoE-/-) mice	atherosclerotic lesions in the aorta serum lipids TNF α , IL1 serum oxLDL, MDA and SOD levels	atherosclerotic lesion formation inhibited oxLDL, MDA, TNF- α and IL-1 β levels ↓ ↓I κ B α inhibited the translocation of P65/ NF- κ B
4	(44)	In vivo and in vitro study	Lab4P 5×10 ⁸ colony		Cell viability Cell proliferation,	↓ LDL/VLDL ↑ HDL

		<p>The Lab4P Consortium of Probiotics Attenuates Atherosclerosis in LDL Receptor Deficient Mice Fed a High Fat Diet and Causes Plaque Stabilization by Inhibiting Inflammation and Several Pro-Atherogenic Processes</p>	<p>forming units (CFU)/mouse/day; 100 billion CFU/day equivalent human dose) for 12 weeks</p>	<p>male LDLr^{-/-} mice (8-weeks-old) fed HFD [21% w/w pork lard and 0.15% w/w cholesterol supplemented with THP-1 monocytes were cultured and differentiated into macrophages</p>	<p>monocyte chemotactic protein (MCP)-1-driven monocytic migration uptake of DiI-labeled oxidized LDL (oxLDL), macropinocytosis radioactive-based cholesterol efflux from foam cells The levels of ROS in cells in vitro phagocytosis HASMC migration</p>	<p>↓ LDL/VLDL:HDL (TC):HDL ↑ TC:LDL/VLDL ratio ↓ % plaque content ↓ percentage occlusion ↓ plaque lipid content ↓ plaque macrophage ↑ Iα-smooth muscle cell actin (αSMA) staining, indicative of plaque stabilization ↓ proliferation of THP-1 macrophages without decreasing cell viability ↓ Uptake of DiI-labeled oxLDL ↑ cholesterol efflux ↓ macropinocytosis ↑ phagocytosis ↓ CD36 mRNA expression ↑ ABCA1, LXRα MIGRATION ATTENUATED</p>
5	(45)	<p>In vivo and in vitro study Modulation of anti-inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 cell line and mouse model at gene expression level with indigenous putative probiotic lactobacilli</p>	<p>Lactobacillus plantarum Lp91 1x10⁹ colony forming unit (cfu)/ml</p>	<p>THP-1 derived macrophage +LPS 100ng/ml 32 adult male (7–8 weeks old) Swiss Albino mice weighing 25–30 g + Normal diet + LPS</p>	<p>TNFα IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin</p>	<p>↓ TNFα, IL-6, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin</p>

6	(46)	Alleviation of LPS-Induced Inflammation and Septic Shock by <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> K8 Lysates	1011 colony-forming units (CFUs)/mL	THP-1 derived macrophage +LPS 100ng/ml Male BALB/c mice (seven-weeks-old, n=4/group, Narabiotech, Seoul, Korea) were used for experiments. Endotoxin shock was induced by IP injection of LPS in PBS. In some experiments, mice were injected with various concentrations of LPS (10 to 40 mg/kg)	TNF α Phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear factor (NF)- κ B negative regulator of TLR4 signaling SOCS1, A20	↓TNF α ↓Phosphorylation of p38 and c-Jun N-terminal kinase (JNK) ↓Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and nuclear factor (NF)- κ B ↑ negative regulator of TLR4 signaling SOCS1, A20
---	------	---	-------------------------------------	--	---	--

REFERENCE

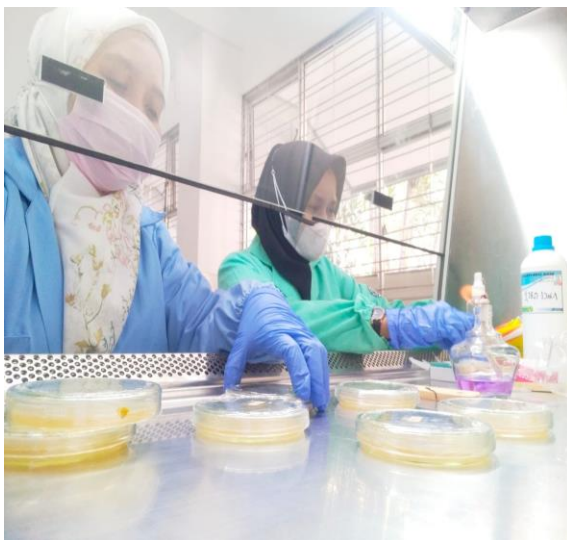
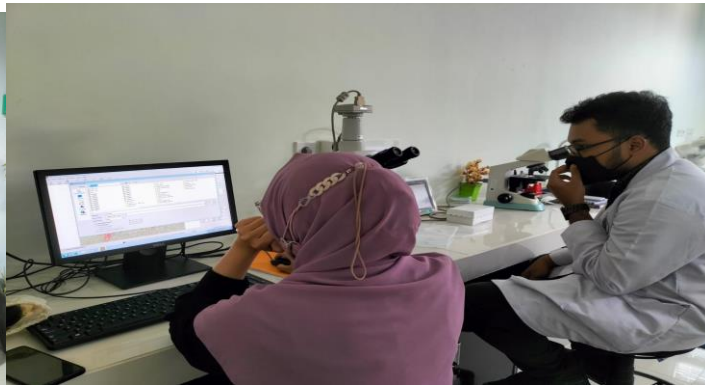
1. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association [Internet]. Vol. 139, Circulation. 2019. 56–528 p. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIR.0000000000000659>
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2015 update : A report from the American Heart Association. Vol. 131, Circulation. 2015. 29–39 p.
3. Gheorghe A, Griffiths U, Murphy A, Legido-Quigley H, Lamptey P, Perel P. The economic burden of cardiovascular disease and hypertension in low- and middle-income countries: A systematic review. BMC Public Health [Internet]. 2018 Aug 6 [cited 2022 Aug 20];18(1):1–11. Available from: <https://bmcpublichealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12889-018-5806-x>
4. Foy AJ, Mandrola JM. Heavy Heart: The Economic Burden of Heart Disease in the United States Now and in the Future. Prim Care [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 Aug 20];45(1):17–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29406942/>
5. Alissa EM, Ferns GA. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. J Nutr Metab. 2012;2012.

6. Asgary S, Rastqar A, Keshvari M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. <https://doi.org/10.1080/0731572420171410867> [Internet]. 2018 Jul 4 [cited 2022 Aug 20];37(5):429–55. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.2017.1410867>
7. Wijaya S. Indonesian food culture mapping: A starter contribution to promote Indonesian culinary tourism. *Journal of Ethnic Foods*. 2019;6(1):1–10.
8. Harmayani E, Anal AK, Wichienchot S, Bhat R, Gardjito M, Santoso U, et al. Healthy food traditions of Asia: Exploratory case studies from Indonesia, Thailand, Malaysia, and Nepal. *Journal of Ethnic Foods*. 2019;6(1):1–18.
9. Patra JK, Das G, Paramithiotis S, Shin HS. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: A review. *Front Microbiol*. 2016;7(SEP):1–15.
10. Priyanka B, Patil RK, Dwarakanath S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian J Med Res* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Aug 20];144(3):327. Available from: </pmc/articles/PMC5320838/>
11. Lee KW, Shim JM, Kim DW, Yao Z, Kim JA, Kim HJ, et al. Effects of different types of salts on the growth of lactic acid bacteria and yeasts during kimchi fermentation. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2018;27(2):489–98. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0251-7>
12. He J, Li F, Wang Y, Wu H, Yang H. Fermentation characteristics and bacterial dynamics during Chinese sauerkraut fermentation by *Lactobacillus curvatus* LC-20 under varied salt concentrations reveal its potential in low-salt suan cai production. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2021;132(1):33–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.03.009>
13. Ahmed S, Ashraf F, Tariq M, Zaidi A. Aggrandizement of fermented cucumber through the action of autochthonous probiotic cum starter strains of *Lactiplantibacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*. *Ann Microbiol*. 2021;71(1).
14. Major N, Bažon I, Išić N, Kovačević TK, Ban D, Radeka S, et al. Bioactive Properties, Volatile Compounds, and Sensory Profile of Sauerkraut Are Dependent on Cultivar Choice and Storage Conditions. *Foods*. 2022;11(9).
15. Ji F di, Ji BP, Li B, Han BZ. Note. Microbial changes during the salting process of traditional pickled Chinese cabbage. *Food Science and Technology International*. 2007;13(1):11–6.
16. Cho SD, Lee EJ, Bang HY, Kim BS, Kim GH. The effects of spring Kimchi cabbage pre-treatment and storage conditions on Kimchi quality characteristics. *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*. 2017;35(6):747–57.
17. Thakur Pran Krishna, Panja Payel, Kabir Jahangir. Effect of Temperature on Fermentation and Quality of Sauerkraut. Article in *Indian Journal of Ecology* [Internet]. 2017;(44):494–6. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/319547291>
18. Mihafu FD, Issa JY, Kamiyango MW. Implication of sensory evaluation and quality assessment in food product development: A review. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 2020;8(3):690–702.
19. Hamida Jdir, Mourad Jridi, Mahmoud Mabrouk, M.A. Ayadi MN, Nacim Zouari NF. The Rocket , *Diplotaxis simplex* , as a Functional Ingredient : LC-ESI-MS Analysis and Its Effect on Antioxidant and

- Physical ... The Rocket , *Diploaxis simplex* , as a Functional Ingredient : LC-ESI-MS Analysis and Its Effect on Antioxidant and Physical P. 2017;5(March):197–204.
20. Ahmadsah LSF, Min SG, Han SK, Hong Y, Kim HY. Effect of low salt concentrations on microbial changes during Kimchi fermentation monitored by PCR-DGGE and their sensory acceptance. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(12):2049–57.
 21. Pyar H, Peh KK. CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS USING BIOLOG RAPID IDENTIFICATION SYSTEM. 2014;6(1).
 22. Reynolds J, Moyes R, Breakwell DP. Differential Staining of Bacteria: Endospore Stain. *Curr Protoc Microbiol.* 2009;15(1):1–5.
 23. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments.* 2012;(62):1–5.
 24. Bahram M, Anslan S, Hildebrand F, Bork P, Tedersoo L. Newly designed 16S rRNA metabarcoding primers amplify diverse and novel archaeal taxa from the environment. *Environ Microbiol Rep.* 2019;11(4):487–94.
 25. Wick RR, Judd LM, Holt KE. Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biol.* 2019;20(1):1–10.
 26. Nygaard AB, Tunsjø HS, Meisal R, Charnock C. A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Sci Rep.* 2020;10(1):3209.
 27. de Coster W, D’Hert S, Schultz DT, Cruts M, van Broeckhoven C. NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics.* 2018;34(15):2666–9.
 28. Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL. Centrifuge: rapid and accurate classification of metagenomic sequences, version 1.0.4_beta. *bioRxiv [Internet].* 2016;26(12):054965. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27852649><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5131823><http://www.biorxiv.org/content/early/2016/05/25/054965.abstract>
 29. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *The BMJ.* 2021;372.
 30. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *Int J Prev Med [Internet].* 2014 [cited 2021 Nov 5];5(8):927. Available from: </pmc/articles/PMC4258672/>
 31. Volobueva A, Zhang D, Grechko A v., Orekhov AN. Foam cell formation and cholesterol trafficking and metabolism disturbances in atherosclerosis. *Cor Vasa [Internet].* 2019;61(1):E48–54. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2018.06.006>
 32. Stefanadis C, Antoniou CK, Tsiachris D, Pietri P. Coronary atherosclerotic vulnerable plaque: Current perspectives. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(3):1–18.
 33. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med [Internet].* 2015 Nov 1 [cited 2020 Sep 24];278(5):483–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/joim.12406>

34. Kolodgie FD, Burke AP, Nakazawa G, Virmani R. Is pathologic intimal thickening the key to understanding early plaque progression in human atherosclerotic disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 May;27(5):986–9.
35. Bintsis T. *Foodborne pathogens.* 2017;3(March):529–63.
36. Lewis E, Hudson JA, Cook N, Barnes JD, Haynes E. Next-generation sequencing as a screening tool for foodborne pathogens in fresh produce. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2020;171(October 2019):105840. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105840>
37. Jagadeesan B, Gerner-Smidt P, Allard MW, Leuillet S, Winkler A, Xiao Y, et al. The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice. *Food Microbiol.* 2019;79(June 2018):96–115.
38. Botta C, Cocolin L. Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: Culture-dependent and -independent approaches. *Front Microbiol.* 2012;3(JUL):1–10.
39. Ridwan R, Rusmana I, Widyastuti Y, Wiryawan KG, Prasetya B, Sakamoto M, et al. Fermentation characteristics and microbial diversity of tropical grass-legumes silages. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2015;28(4):511–8.
40. Wagner BD, Grunwald GK, Zerbe GO, Mikulich-Gilbertson SK, Robertson CE, Zemanick ET, et al. On the use of diversity measures in longitudinal sequencing studies of microbial communities. *Front Microbiol.* 2018;9(MAY).
41. Malik M, Suboc TM, Tyagi S, Salzman N, Wang J, Ying R, et al. *Lactobacillus plantarum* 299v supplementation improves vascular endothelial function and reduces inflammatory biomarkers in men with stable coronary artery disease. *Circ Res.* 2018;123(9):1091–102.
42. Hofeld BC, Puppala VK, Tyagi S, Woo Ahn K, Anger A, Jia S, et al. *Lactobacillus plantarum* 299v probiotic supplementation in men with stable coronary artery disease suppresses systemic inflammation. *Scientific Reports |* [Internet]. 123AD;11:3972. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83252-7>
43. Hassan A, Din AU, Zhu Y, Zhang K, Li T, Wang Y, et al. Anti-atherosclerotic effects of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 in ApoE^{-/-} mice through modulation of proinflammatory cytokines and oxidative stress. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(14):6337–50.
44. O VL, Chan YH, Williams JO, Alotibi R, Alahmadi A, Rodrigues NP, et al. The Lab4P Consortium of Probiotics Attenuates Atherosclerosis in LDL Receptor Deficient Mice Fed a High Fat Diet and Causes Plaque Stabilization by Inhibiting Inflammation and Several Pro-Atherogenic Processes. 2021; Available from: <https://doi.org/10.1002/mnfr.202100214>
45. Aparna V, Harsh Panwar S, Chauhan R, Raj, Duary K, Kumar R, et al. Modulation of anti-inflammatory response in lipopolysaccharide stimulated human THP-1 cell line and mouse model at gene expression level with indigenous putative probiotic lactobacilli.
46. Kim G, Choi KH, Kim H, Chung DK. Alleviation of lps-induced inflammation and septic shock by lactiplantibacillus plantarum k8 lysates. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).

Lampiran 4. Publikasi Media Massa



RISET KOLABORASI INDONESIA UM, UB, UNAIR UNTUK INDONESIA LEBIH SEHAT, INDONESIA LEBIH MAJU

Era yang semakin terbuka, disrupsi yang disebabkan Revolusi Industri 4.0 telah dan akan terus mengubah secara drastis kehidupan manusia. Pandemi Covid-19 mempercepat perubahan di era Revolusi Industri 4.0 di semua sector menyebabkan banyaknya permasalahan baru di semua lini bidang kehidupan masyarakat yang membutuhkan solusi pemecahan cepat. Keterlibatan Perguruan Tinggi melalui penelitian-penelitian yang dilakukan menjadi factor kunci dalam melahirkan inovasi-inovasi yang tepat dalam menjawab permasalahan saat ini. Penelitian kolaboratif multidisipliner, antar institusi menjadi penopang utama lahirnya terobosan-terobosan baru yang tepat guna untuk menjawab kebutuhan masyarakat saat ini. Riset Kolaboratif Indonesia (RKI) merupakan salah satu program yang diusung oleh Kemendikbud dalam melahirkan penelitian-penelitian yang berkualitas dan mendorong ke hilirisasi produk untuk membantu mensukseskan program-program Pemerintah Indonesia. Skema RKI diantaranya adalah penelitian kolaboratif yang melibatkan Kerjasama antar 16 PTNBH se Indonesia, Universitas Luar Negeri, dan BRIN.

Tahun ini, UM, UB, Unair lolos seleksi untuk pendanaan RKI dengan mengusung judul . Inovasi Pengembangan Produk Halal Berbasis Budaya Lokal Ekstrak Fermentasi Sambal Lalapan Sebagai Terapi Suportif dalam Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Kardiovaskuler DR. Suharti, SpD, M.Si, DR. Ahmad Munjin Nasih, M.Ag dari UM, berkolaborasi dengan Prof Djanggan Sargowo UB, dan Prof Yudi Her Octaviano, SpJP(K) Unair adalah koordinator utama RKI dari masing-masing universitas. Selain itu tim yang terlibat diantaranya adalah DR. dr. Ermin Rachmawati, M.Biomed; dr. Makhyan Jibril, Larasati Sekar Kinasih, M.Gz, dan juga mahasiswa S1 dari Kedokteran, Biologi serta PPDS Kardiologi. Penelitian ini dilaksanakan di Surabaya dan Malang menggunakan beberapa laboratorium di UB, Unair, dan UM.

Latar belakang yang mendasari dilakukannya penelitian ini adalah penyakit kardiovaskuler utamanya Penyakit Jantung Koroner masih menempati peringkat pertama penyebab kematian dari kelompok Penyakit Tidak Menular di dunia dan juga di Indonesia. Di sisi lain, mayoritas penduduk dunia masih belum disiplin dalam menerapkan pola hidup sehat. Kondisi tambahan lainnya, adalah kemajuan teknologi meningkatkan gaya hidup sedentary. Semua kondisi tersebut merupakan factor resiko utama dari penyakit kardiovaskuler. Tujuan Penelitian ini adalah pengembangan produk berupa pangan fungsional maupun Obat Herbal terstandar untuk Pencegahan maupun Penyakit Kardiovaskuler menggunakan bahan alam dan tradisi budaya local Indonesia. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat membangun, memperluas jejaring kerjasama riset antar universitas. Adanya RKI mampu memperkuat dan transfer keilmuan serta teknologi antara 3 Universitas PTNBH. Untuk menjadikan Perguruan Tinggi di Indonesia berdaya saing internasional, RKI muncul sebagai wadah dalam melahirkan penelitian yang berkualitas dan menghasilkan publikasi-publikasi berupa jurnal internasional terindeks minimal scopus.

1. <https://tugumalang.id/um-ub-dan-unair-kolaborasi-teliti-lalapan-sebagai-terapi-penyakit-jantung-koroner/>
2. <https://www.kompasiana.com/makhyanj/6304d2af04dff01a3e0a9da2/riset-kolaborasi-indonesia-um-ub-unair-untuk->
3. <https://kumparan.com/makhyan-jibril/um-ub-dan-unair-ciptakan-inovasi-produk-halal-untuk-penyaki0t-kardiovaskular-1yiWHIaqGwd/full>