

LAPORAN PENELITIAN Tahun 1 STRATEGIS NASIONAL

TEMA

Kesehatan, penyakit tropis, gizi & obat-obatan

JUDUL PENELITIAN:

**Re-design Sintesa Peptide Antihipertensi Sebagai Bahan Nutraceutical
Komersial Berbasis Protein Alami**

Tim Pengusul

Prof. Tri Agus Siswoyo, M.Agr., Ph.D

NIDN. 0010087004

Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D

NIDN. 0013126705

Ika Oktavianawati, S.Si, M.Sc

NIDN. 0001108005



**UNIVERSITAS JEMBER
November, 2015**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul	: Re-design Sintesa Peptide Antihipertensi Sebagai Bahan Nutraceutical Komersial Berbasis Protein Alami
Peneliti/Pelaksana	
Nama Lengkap	: Prof. TRI AGUS SISWOYO SP., M.Agr., Ph.D
Perguruan Tinggi	: Universitas Jember
NIDN	: 0010087004
Jabatan Fungsional	: Guru Besar
Program Studi	: Agronomi
Nomor HP	: 08179607263
Alamat surel (e-mail)	: triagus.faperta@unej.ac.id
Anggota (1)	
Nama Lengkap	: TRI ARDYATI
NIDN	: 0013126705
Perguruan Tinggi	: Universitas Brawijaya
Anggota (2)	
Nama Lengkap	: IKA OKTAVIANAWATI S.Si, M.Sc
NIDN	: 0001108005
Perguruan Tinggi	: Universitas Jember
Institusi Mitra (jika ada)	
Nama Institusi Mitra	: Kemiri Tani
Alamat	: Jln. Isyak Sujono, Banyuwang, Kalibaru
Penanggung Jawab	: Bpk Sardiman
Tahun Pelaksanaan	: Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan	: Rp 91.000.000,00
Biaya Keseluruhan	: Rp 197.650.000,00

Mengetahui,
Dekan Fakultas Pertanian

Jember, 5 - 11 - 2015
Ketua,

(Dr.Ir. Jani Januar, M.T)
NIP/NIK 195901021988031002

(Prof. TRI AGUS SISWOYO SP., M.Agr.,
Ph.D)
NIP/NIK 197008101998031001

PRAKATA

Dengan Mengucap syukur ke hadirat Allah, segala persiapan, pelaksanaan dan penyusunan hasil penelitian kemajuan dengan judul **“Re-design Sintesa Peptide Antihipertensi Sebagai Bahan Nutraceutical Komersial Berbasis Protein Alami”** telah dapat kami selesaikan.

Penelitian ini dilaksanakan selama dua tahun yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penelitian Tahun Anggaran 2015 untuk itu pada kesempatan ini kami menyampaikan banyak terimakasih.

Kami menyadari bahwa dalam laporan ini masih kekurangan yang tidak kami hindarkan. Untuk itu segala saran dan kritik yang membangun demi perbaikan tulisan ini sangat kami harapkan. Besar harapan kami, tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, 10 November 2015

Tim peneliti

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	2
PRAKATA.....	3
DAFTAR ISI.....	4
DAFTAR GAMBAR.....	5
DAFTAR TABEL	6
ABSTRAK	7
I. PENDAHULUAN.....	8
II. STUDI PUSTAKA	11
III. METODE PENELITIAN	20
IV. HASIL PEMBAHASAN	24
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	35
1. Submitted Patent	
2. Sertificate International Seminar (oral presenter)	
3. Submitted International Journal (agriculture and Agricultural Science Procedia)	

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Diagram road map penelitian	19
2. Tahapan dan luaran tiap kegiatan.....	23
3. A. Tahapan freeze dried protein isolate, B. Hasil protein isolate C. Profile SDS PAGE protein isolate	24
4. ABTS (A) dan ACE inhibitory (B) aktivitas protein Isolat (Gg-PI).....	26
5. Analisis aktivitas protein hidrolisis (alchalase) menggunakan metode ABTS dan ACE inhibitor.....	27
6. Kemampuan hidrolisis enzim yang immobilisasi pada sistem sol-gel.	27
7. SEM photogram sol-gel-enzim. A sol-gel (3000x); B. Sol-gel (6000x); C. Sol-gel-enzim (2500x) dan D. Sol-gel-enzim (6000x)	28
8. Spektrum FTIR dari sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+)enzim	29
9. DSC Thermograph dari sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+)enzim	30
10. Hidrolisis protein isolate biji melinjo berdasarkan berdasarkan waktu (A); suhu (B) dan jumlah substrat (C); dan jumlah enzim (D).	31
11. Reuse sol-gel(+)enzim dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo.	32

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Asam Amino komposisi dari protein isolate dari biji melinjo.....	25

ABSTRAK

Hipertensi adalah masalah serius yang dihadapi oleh masyarakat dunia termasuk Indonesia. Hipertensi adalah salah satu faktor yang mengakibatkan terjadinya stroke, gagal ginjal dan, kerusakan vaskular. Penanganan yang sulit akibat dari kompleksnya gejala, komplikasi dan keadaan atau penyakit yang mendasari hipertensi, mengakibatkan penggunaan lebih dari satu macam obat (polifarmasi) secara bersamaan dilakukan, akan tetapi terjadinya interaksi obat yang berbeda tidak jarang mengakibatkan efek samping yang cukup berbahaya. Oleh sebab itu diperlukan suatu upaya pencarian suatu obat alami yang mampu untuk mempertahankan atau meningkatkan sistem fisiologis pada tubuh terutama ditujukan untuk pencegahan atau pengobatan terhadap hipertensi.

Penggunaan senyawa alami biofungsional protein sebagai nutraceutical merupakan suatu pilihan dikarenakan kespesifikanya dalam fungsi fisiologis. Pada penelitian sebelumnya telah ditemukan sumber material protein antioksidan yang berpotensi sebagai peptida antihipertensi dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*). Penemuan tersebut merupakan dasar terpenting untuk dapat dikembangkan kearah produksi secara komersial. Sumber material protein dari *Gnetum gnemon* inilah, kearah komersialisasi dengan cara re-design metode menggunakan metode “*sol-gel immobilized enzyme*” pada kolum akan diperoleh peptida aktif antihipertensi sebagai bahan nutraceutical berbahan dasar protein/peptide.

Hasil penelitian yang telah dilakukan seluruhnya (100%) dari seluruh rencana pekerjaan/target pada tahun I (2015), dengan rincian hasil sebagai berikut : 1) diperolehnya protein isolate dan karakter protein isolate dari biji melinjo sebagai dasar/bahan untuk produksi peptide Gg-AH, 2) diperolehnya enzim yang telah diimmobilisasi dan karakterisasi enzim yang terimmobilisasi (sol-gel(+enzim), 3) Diperolehnya kondisi optimal dalam produksi peptide antihipertensi pada berbagai kondisi (suhu, waktu, konsentrasi substrat dan immobilisasi sol-gel(+enzim). 4) Diperolehnya model kondisi optimal dalam kondisi suhu inkubasi 50°C, lama waktu 4-5 jam dengan rasio 0.2% E/S, 4) telah didaftarkan **patent** dengan judul “**Metode Produksi Peptida Antioksidan Generasi Baru Dari Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon*) Sebagai Bahan Nutraceutical Food Supplement**”, dan 5) sebagian hasil penelitian ini telah dipresentasikan dalam **International seminar Conference on Food, agriculture and Natural Resources (IC-FANRES 2015)** dan telah submitkan dalam **Agriculture and Agricultural Science Procedia** (Elsevier).

Dari hasil kemajuan ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar dalam upaya melanjutkan ke arah re-desing kolum sehingga produksi peptide antihipertensi ini dapat dilaksanakan. Sehingga target sampai tahun ke 2 bisa terselesaikan.

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hipertensi adalah masalah serius yang dihadapi oleh masyarakat dunia termasuk Indonesia. Menurut WHO (2003) hipertensi diperkirakan menjadi penyebab 4,5% dari total penyakit di dunia dengan prevalensi yang sama, baik di negara berkembang maupun di negara maju. Beberapa penyakit degenerative seperti jantung dan hipertensi juga cenderung menunjukkan peningkatan (Bappenas, 2007). Hipertensi adalah salah satu faktor resiko penyakit jantung koroner dan penyakit cerebrovaskuler. Selain itu, hipertensi juga penyebab dari hipertrofi jantung dan gagal jantung (*hypertensive heart disease*), pecahnya aorta, dan gagal ginjal (Kumar dkk., 2003). Kondisi lain yang menyebabkan hipertensi meliputi *pheochromocytoma*, *Cushing syndrome*, *aldosteronisme primer*, *coarction aorta*, dan substansi yang sifatnya eksogen seperti *estrogen*, *glukokortikoid*, *sympathomemetic amines*, anti inflamasi *nonsteroid*, konsumsi alkohol jangka panjang, dan makanan yang mengandung *tiramin* yang dikombinasikan dengan *monoamine oksidase inhibitors* (Wells dkk., 2000). Kompleksnya gejala, komplikasi dan keadaan atau penyakit yang mendasari hipertensi, maka tidak jarang digunakan lebih dari satu jenis obat (*polifarmasi*) secara bersamaan yang digunakan dalam pengobatan hipertensi. Pengobatan dengan beberapa obat sekaligus (*polifarmasi*) memudahkan terjadinya interaksi obat (Setiawati, 1995). Angka kejadian interaksi obat cukup sering. Satu studi di rumah sakit menunjukkan, terjadi sekitar 7% kasus interaksi obat ketika pasien mengkonsumsi 6-10 obat berbeda, tapi terjadi sekitar 40% kasus ketika pasien mengkonsumsi 16-20 jenis obat yang berbeda (Stockley, 1999). Peningkatan *insidensi* efek samping yang jauh melebihi peningkatan obat yang diberikan bersama ini diperkirakan akibat terjadinya interaksi obat yang juga makin meningkat (Setiawati, 1995). Berdasarkan hal-hal tersebut maka diperlukan suatu penelitian yang mencari sumber pengobatan alami yang memanfaatkan sumber local yang dimiliki.

Dalam kurun waktu dua dekade ini para peneliti telah berupaya untuk dapat menemukan protein baru alami yang dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan protein fungsional alami (De Lucca, 2000; Hancock, 2000; Welling *et al.*,

2000; Selitrennikoff, 2001). Keanekaragaman protein fungsional menjadikan suatu pertimbangan dalam menemukan bahan alami yang bisa dimanfaatkan di beberapa bidang (Marshall, 2003). Kemajuan teknologi memungkinkan untuk dapat mengembangkan teknik produksi protein baru melalui rekayasa protein alami (Wang and Mejia, 2005).

Sumber protein alami dapat diperoleh dari hewan atau tumbuhan. Indonesia kaya akan biodiversitas tumbuhan lokal yang berpotensi sebagai sumber protein fungsional. Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*), banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji melinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon*) terdiri dari 58% pati, 16.4% lemak, 9-10% protein dan 1% phenolik (Siswoyo, 2004; Siswoyo dan Aldino, 2007). Kandungan protein pada biji yang relatif sangat besar merupakan suatu potensi sebagai sumber protein fungsional alami. Dari hasil penelitian sebelumnya (**SINas-RISTEK 2013 dan Stranas-DIKTI 2013**) telah diketemukan adanya kemampuan sebagai polipeptide antioksidan (*free radical scavenging*) dan peptide aktif dalam menghambat aktivitas enzim "Angeotinsin-converting enzyme" sebagai peptide antihipertensi (Siswoyo *et al.*, 2011; Siswoyo, 2012). Dari hasil tersebut dilanjutkan dalam usulan penelitian ini, dengan melakukan pengembangan teknologi atau inovasi bioreactor kolom kontinu dengan metode sintesa dan pemisahan dalam suatu reactor untuk dapat meningkatkan produksi peptide antihipertensi generasi baru dari protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*) dengan aktivitas tinggi. Kedepannya kebutuhan akan bahan komersial *Nutraceutical Food Supplement* berupa protein fungsional (antihipertensi) dengan kemampuan yang tinggi dapat terpenuhi secara cepat dan tepat.

1.2 Perumusan masalah

Dengan dikembangkan teknologi atau inovasi dalam produksi peptida antihipertensi dari protein alami, dengan cara re-design metode untuk produksi peptida secara efektif untuk memperoleh hasil yang optimal. Kedepannya kebutuhan pasar akan bahan bioaktif peptida fungsional khususnya peptida antihipertensi akan dapat terpenuhi dengan cepat dan tepat dan diharapkan dapat menunjang

kebutuhan sektor yang lain seperti industri pangan (*nutraceutical*), farmasi dan kosmetik serta masyarakat luas.

1.3 Tujuan dan Manfaat Khusus

Secara khusus usulan penelitian ini bertujuan untuk ***menghasilkan suatu teknologi dan prototipe bioreactor dalam pelipatgandaan produksi peptida antihipertensi dari protein alami sebagai bahan nutraceutical food supplement komersial.*** Inovasi teknologi produksi dan hasil produknya ini kemungkinan dapat diterapkan sebagai bahan *Nutraceutical Food Supplement* dalam pencegahan hipertensi atau sebagai protein fungsional pada produk pangan.

Sasaran akhir rangkaian penelitian/kegiatan yang dilakukan akan diperoleh bentuk luaran berupa: 1) Teknologi produksi peptida antihipertensi sebagai bahan komersial *Nutraceutical Food Supplement*; 2) *Prototipe biorektor dalam memproduksi* peptida antihipertensi 3) Diperoleh material peptida antihipertensi sebagai bahan komersial *Nutraceutical Food Supplement*; 4) Patent/ Intellectual Property Protection; 4) Jurnal Ilmiah material Nasional/Internasional.

Manfaat penelitian ini adalah: 1) Membantu *memecahkan permasalahan nasional terutama dibidang kesehatan dan pangan sehat (nutraceutical)* dalam penyediaan bahan baku komersial alam yang berbasis protein alami dari biji melinjo dan 2) Penyediaan “*paket teknologi*” dalam *menghasilkan dan memperoleh bahan baku aktif berupa peptida antihipertensi berbasis protein alami dari biji melinjo secara aman, mudah dan efektif serta ekonomis dengan memanfaatkan potensi kekayaan alami tanaman asli Indonesia.*

1.4 Pentingnya atau Keutamaan Rencana Penelitian Ini

Sumber protein alami dapat diperoleh dari hewan atau tumbuhan. Indonesia kaya akan biodiversitas tumbuhan lokal yang berpotensi sebagai sumber protein fungsional. Bioavailabilitas tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*) di Indonesia sangat melimpah dan banyak dibudidayakan sebagai penghasil biji. Dengan memanfaatkan potensi bahan baku yang melimpah dan sentuhan teknologi maka kebutuhan pasar akan bahan bioaktif polipeptida fungsional khususnya peptida antihipertensi akan dapat terpenuhi dengan baik dan diharapkan dapat menunjang kebutuhan sektor yang lain seperti industri pangan (*nutraceutical*), farmasi dan kosmetik serta masyarakat luas. Manfaat dari penelitian ini adalah dapat membantu ***memecahkan***

permasalahan nasional terutama dibidang kesehatan dan pangan sehat (nutraceutical) dalam penyediaan bahan baku komersial alami dan juga suatu “paket teknologi” dalam menghasilkan dan memperoleh bahan baku aktif berupa peptida antihipertensi alami dari biji melinjo secara aman, mudah dan efektif serta ekonomis dengan memanfaatkan potensi kekayaan alami tanaman asli Indonesia.

BAB II. STUDI PUSTAKA

2.1 Hipertensi

Hipertensi merupakan peningkatan tekanan darah > 140/90 mmHg. Hipertensi diklasifikasikan atas hipertensi primer (esensial) (90-95%) dan hipertensi sekunder (5-10%). Dikatakan hipertensi primer bila tidak ditemukan penyebab dari peningkatan tekanan darah tersebut, sedangkan hipertensi sekunder disebabkan oleh penyakit/keadaan seperti feokromositoma, hiperaldosteronisme primer (sindroma Conn), sindroma Cushing, penyakit parenkim ginjal dan renovaskuler, serta akibat obat (Bakri, 2008).

Ginjal mengontrol tekanan darah melalui pengaturan volume cairan ekstraseluler dan sekresi renin. Sistem Renin-Angiotensin merupakan system endokrin yang penting dalam pengontrolan tekanan darah. Renin disekresi oleh juxtaglomerulus aparatus ginjal sebagai respon glomerulus underperfusion atau penurunan asupan garam, ataupun respon dari sistem saraf simpatetik (Gray, *et al.* 2005).

Mekanisme terjadinya hipertensi adalah melalui terbentuknya angiotensin II dari angiotensin I oleh angiotensin I-converting enzyme (ACE). ACE memegang peranan fisiologis penting dalam mengatur tekanan darah. Darah mengandung angiotensinogen yang diproduksi hati, yang oleh hormon rennin (diproduksi oleh ginjal) akan diubah menjadi angiotensin I (dekapeptida yang tidak aktif). Oleh ACE yang terdapat di paru-paru, angiotensin I diubah menjadi angiotensin II (oktapeptida yang sangat aktif). Angiotensin II berpotensi besar meningkatkan tekanan darah karena bersifat sebagai vasoconstrictor melalui dua jalur, yaitu: a. Meningkatkan sekresi hormon antidiuretik (ADH) dan rasa haus. ADH diproduksi di hipotalamus (kelenjar pituitari) dan bekerja pada ginjal untuk mengatur osmolalitas dan volume

urin. Dengan meningkatnya ADH, sangat sedikit urin yang diekskresikan ke luar tubuh (antidiuresis) sehingga urin menjadi pekat dan tinggi osmolalitasnya. Untuk mengencerkan, volume cairan ekstraseluler akan ditingkatkan dengan cara menarik cairan dari bagian intraseluler. Akibatnya volume darah meningkat sehingga meningkatkan tekanan darah. b. Menstimulasi sekresi aldosteron dari korteks adrenal. Aldosteron merupakan hormon steroid yang berperan penting pada ginjal. Untuk mengatur volume cairan ekstraseluler, aldosteron akan mengurangi ekskresi NaCl (garam) dengan cara mereabsorpsinya dari tubulus ginjal. Naiknya konsentrasi NaCl akan diencerkan kembali dengan cara meningkatkan volume cairan ekstraseluler yang pada gilirannya akan meningkatkan volume dan tekanan darah (Gray *et al.*, 2005).

2.2 Antihipertensi

Antihipertensi adalah suatu upaya untuk dapat mengurangi atau mengobati hipertensi (tekanan darah tinggi) anti hipertensi terapi berusaha untuk mencegah komplikasi tekanan darah tinggi, seperti stroke dan infark miokard. Bukti menunjukkan bahwa penurunan tekanan darah dengan 5 mmHg dapat menurunkan risiko stroke sebesar 34%, penyakit jantung iskemik sebesar 21%, dan mengurangi kemungkinan demensia, gagal jantung, dan kematian akibat penyakit kardiovaskular (Law *et al.*, 2003). Ada banyak kelas antihipertensi, yang menurunkan tekanan darah diantaranya adalah diuretik thiazide, ACE inhibitor, calcium channel blockers ini, beta blocker, dan antagonis reseptor angiotensin II atau ARB.

Kelas beberapa antihipertensi berbeda dalam profil efek samping, kemampuan untuk mencegah titik akhir, dan biaya. Pemilihan agen yang lebih mahal, mana yang lebih murah akan sama-sama efektif, mungkin memiliki dampak negatif (Nelson *et al.*, 2001). Pada 2009, memberikan suatu rekomendasi untuk penggunaan diuretik thiazide sebagai pilihan utama dalam pengobatan untuk tekanan darah tinggi (hipertensi) (Wright and Musini, 2009). Meskipun bukti klinis menunjukkan blocker saluran kalsium dan diuretik tipe thiazide lebih baik dalam pengobatan untuk kebanyakan orang, sedangkan untuk jenis obat yang berhubungan dengan penghambat aktivitas ACE direkomendasikan oleh NICE di Inggris untuk mereka yang di bawah 55 tahun.

2.3 Protein Antihipertensi

Protein adalah salah satu produk esensial yang diperlukan semua makhluk hidup dan mudah diserap oleh tubuh dalam bentuk peptida dan asam amino. Beberapa peptida memiliki aktivitas fungsional dan fisiologi seperti antitrombotik, antioksidan, antibakteri, antifungi, sensori dan meningkatkan nilai nutrisi makanan (Iwaniak and Minkiewicz, 2007). Beberapa fragmen dari urutan protein yang bersumber dari berbagai macam makanan dapat dilepaskan secara hidrolisis, dan kebanyakan menunjukkan beberapa aktivitas biologis. Fragmen ini, atau peptida bioaktif, biasanya dihasilkan secara *in vivo* dengan aksi enzim pencernaan. Mereka juga dapat diperoleh secara *in vitro* menggunakan enzim tertentu, atau diproduksi selama pembuatan makanan tertentu. Sejak tahun 1979, telah ditemukan peptida bioaktif dengan aktivitas biologis yang berbeda seperti yang dijelaskan oleh Gobetti *et al.*, (2000). Peptida antihipertensi dapat diperoleh dari protein makanan dari hewan dan tumbuhan. Pada saat ini sumber utama peptida antihipertensi berasal dari protein susu dan telur. Kedua jenis makanan tersebut merupakan sumber utama makanan kita sehari-hari, begitu juga peptida tersebut dapat diperoleh dari ikan, jagung, kedelai, dan berbagai sayuran, juga dapat menjadi sumber penting dari peptida antihipertensi.

Mekanisme penghambatan peptida terhadap aktivitas ACE terjadi pada dua jalur, yaitu jalur penghambatan pembentukan senyawa vasokonstriktor dan memicu terjadinya degradasi zat vasodilator. Penghambatan enzim oleh peptida dimungkinkan karena adanya interaksi peptida dengan zona anionik berbeda dari situs katalitik enzim, atau dengan substrat yang berikatan dengan enzim tersebut (Meisel, 2006). Peptida ini biasanya dapat menghambat aktivitas ACE dengan jumlah asam amino antara 2 dan 12 asam amino, meskipun dari beberapa kasus ditemukan sampai 27 asam amino. Hubungan struktur dan penghambatan aktivitas ACE tampaknya akan lebih efektif bila jumlah asam amino kurang dari 7 asam amino. Pengikatan dengan enzim secara khusus terjadi pada urutan tripeptida carboxi-terminal dari peptida, yang dapat berinteraksi dengan tiga wilayah pusat aktif dari ACE. Ikatan ini akan dapat lebih menguntungkan jika terjadi pada jenis asam amino dengan sifat hidrofobik pada tida posisi akhirnya, seperti Trp, Tyr, Phe, dan Pro (Ondetti dan Cushman, 1982).

2.4 Protein Modifikasi

Modifikasi protein dapat dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan kemampuan aktivitas protein tersebut. Hidrolisis asam dan hidrolisis secara biologis (enzimatik) adalah dua metode utama dalam melakukan modifikasi protein hal ini untuk menghasilkan peptide. Metode hidrolisis asam yang relative sangat sederhana dan lebih murah, akan tetapi lebih sulit untuk mengontrol reaksinya dan juga mengakibatkan kerusakan pada asam amino yang dihasilkan. Metode enzimatik lebih mudah untuk mengontrol, menggunakan kondisi ringan, dan tidak menyebabkan kerusakan asam amino. Oleh karena itu, hidrolisis enzimatik merupakan metode yang umum digunakan untuk memproduksi hidrolisat protein terutama ditujukan bahan makanan. Ada beberapa jenis enzim yang sering digunakan dalam menghasilkan beberapa jenis peptide aktif. Proteinase (endopeptidases) seperti tripsin, subtilisin, chymotrypsin, thermolysin, pepsin, proteinase K, papain, dan plasmin pada umumnya digunakan sebagai proteolitik protein yang terkandung pada makanan (Yamamoto *et al.*, 2003). Hewan, tumbuhan, dan mikroorganisme adalah sumber utama enzim yang digunakan untuk produksi peptide bioaktif. Sedangkan enzim yang berasal dari non-hewan adalah papain atau pronase, enzim ini telah banyak digunakan dalam menghidrolisis protein kedelai. Protein hidrolisat telah teruji dengan menunjukkan kemampuannya dalam menginduksi pertumbuhan dan meningkatkan produksi budaya hibridoma mouse dengan media protein bebas (Franek dan lain-lain 2000). Proteinase dari mikroorganisme seperti *Mucor sp*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* 1389, *Aterricola* 3942 juga digunakan untuk menghidrolisis protein dan menghasilkan peptide, *Aspergillus oryzae* peptidase digunakan untuk menghidrolisis protein kedelai untuk menghasilkan peptide dengan panjang rantai pendek (kebanyakan panjang rantai peptidanya kurang lebih tujuh peptida) (Korhonen and Pihlanto 2003). Jenis enzim yang dihasilkan dari *Mucor piriformis* dapat juga digunakan dalam produksi peptida dari isolasi protein dari kedelai (Lidan *et al.*, 2001). Selain itu dengan melakukan hidrolisis protein dapat juga akan menghasilkan sesuatu produk dengan bau, dan rasa pahit yang berkurang.

Untuk menghasilkan suatu produk yang lebih baik dapat dilakukan dengan melakukan kombinasi hidrolisis antara enzimatik dan asam. Untuk menghasilkan

protein kedelai hydrolysates dengan konsentrasi tinggi, tepung kedelai dihilangkan lemaknya menggunakan larutan asam klorida rendah sebelum dilakukan degradasi protein dengan tujuan untuk menghambat gelasi protein kedelai selama sterilisasi panas (Lee dan Lee 2000). Dengan memberikan asam karboksilat sebelum melakukan hidrolisis rata-rata peptide yang dihasilkan antara 10 sampai 100 (Hirano and Koide, 2000). Perlakuan panas protein juga dapat mempengaruhi efisiensi hidrolisis enzim. Fischer *et al.*, (2002) menemukan bahwa makanan yang berasal dari kedelai jika dipanaskan dengan dikelembaban tinggi akan memiliki tingkat peptide yang teragregat lebih tinggi.

2.5 Melinjo (*Gnetum gnemon*)

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*), adalah tanaman asli Indonesia termasuk tanaman purba dan banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji melinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Komposisi komponen biji melinjo terdiri dari 9 - 11% protein, 16.4 % lipid, 58 % starch dan sedikit kandungan phenolic/flavonoids. Karakter pati biji melinjo menggunakan X-ray diffraction menunjukkan type A dan menggunakan analisa DSC mempunyai 2 puncak titik endothermic, peak pertama berupa titik gelatinisasi sekitar 60-78°C, dan titik endothermik yang lain sekitar 95-115 °C (Siswoyo, 2004). Berdasarkan persamaan Avrami equation, laju retrogradation pati biji mlinjo sangat lambat dibandingkan dengan biji melinjo yang sudah di deffating. Tinggi nilai kompleknisasi antara pati dan lipid dimungkinkan penyebab terhambat retrogradasi selama penyimpanan (Siswoyo, 2004).

Potensi aktifitas antioksidan dan total kandungan phenolik pada jaringan tanaman melinjo seperti akar, batang, daun, biji dan kulit biji juga dipelajari. Total phenolik pada jaringan sangat bervariasi antara 5.97 and 9.91 mg GAE g⁻¹, sedangkan kandungan flavonoik antara 0.85 – 3.14 mg QE g⁻¹. Tingginya aktivitas radical scavenging ditemukan pada jaringan akar dengan kisaran 37.27 mg VCEAC g⁻¹ sampel. Lebih lanjut, tingkatan aktifitas radical scavenging pada beberapa jenis jaringan sebagai berikut: akar (37.27 mg VCEAC) >daun (36.66 mg VCEAC) > biji (34.08 mg VCEAC)> batang (32.52 mg VCEAC)>kulit biji (32.48 mg VCEAC).

Kandungan phenolik/flavonoik yang tinggi mengindikasikan adanya potensi tinggi sebagai radical scavenging (*Siswoyo and Aldino, 2007*).

Isolasi dan pemurnian protein biji melinjo telah dilakukan dengan menggunakan teknik kombinasi kolom kromatografi seperti ion exchange dan gel filtration merupakan langkah pertama dalam usaha untuk dapat mengidentifikasi dan mengkarakter potensi aktifitas protein sebagai antioxidant, free radical-scavenging dan antimikrobia. Sebagaimana besar protein biji melinjo didominasi oleh protein dengan berat molekul sebesar 30 dan 12 kD (*Siswoyo et al., 2007*) berdasarkan analisis menggunakan MALDI-TOF-MS dinyatakan keduanya protein tersebut adalah jenis baru (*Siswoyo et al., 2011*) dan mempunyai karakter relative lebih stabil pada suhu tinggi jika dikombinasikan dengan NaCl (*Siswoyo, 2006*). Selanjutnya, 2 jenis protein hasil pemurnian menunjukkan protein dengan berat molekul 30 kDa mempunyai potensi antioksidan lebih besar daripada protein dengan berat molekul 12 kDa. (*Siswoyo et al., 2011*). Aktivitas akan meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi protein yang ditambahkan. Aktivitas antioksidan protein ini mempunyai kemampuan yang sama dengan aktifitas BHT pada sistem pengujian emulsi asam linoleic. Dua Jenis protein ini juga menunjukkan potensi sebagai scavenging melawan free radicals seperti DPPH dan superoxide radicals serta kemampuan mereduksi dan mengikat Fe^{2+} dengan kuat. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa protein biji melinjo sangat berpotensi sebagai sumber antioxidant (*Siswoyo et al., 2011*). Lebih lanjut, pengujian potensi protein biji melinjo sebagai antibakteri dan antifungal juga dilakukan. Pengujian dengan menggunakan disk diffusion dan pengukuran turbidity menunjukkan protein biji melinjo sangat efektif menghambat beberapa jenis jamur dan bakteri baik gram negative atau positif seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* *Escherichia coli* and *Salmonella thypi* (*Siswoyo et al., 2007*).

2.6 Peta Jalan/Rodmap Penelitian

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*), adalah tanaman asli Indonesia termasuk tanaman purba dan banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji melinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Komposisi komponen biji melinjo

terdiri dari 9 - 11% protein, 16.4 % lipid, 58 % starch dan sedikit kandungan phenolic/flavonoids. Karakter pati biji melinjo menggunakan X-ray diffraction menunjukkan type A dan menggunakan analisa DSC mempunyai 2 puncak titik endothermic, peak pertama berupa titik gelatinisasi sekitar 60-78°C, dan titik endothermik yang lain sekitar 95-115 °C (**Siswoyo, 2004, Jurnal Ilmu Dasar (5)2:97-102**). Berdasarkan persamaan Avrami equation, laju retrogradation pati biji mlinjo sangat lambat dibandingkan dengan biji melinjo yang sudah di deffating. Tinggi nilai kompleknisasi antara pati dan lipid dimungkinkan penyebab terhambat retrogradasi selama penyimpanan (**Siswoyo, 2004, Jurnal Teknologi & Industri Pangan, (15) 2: 113-118**).

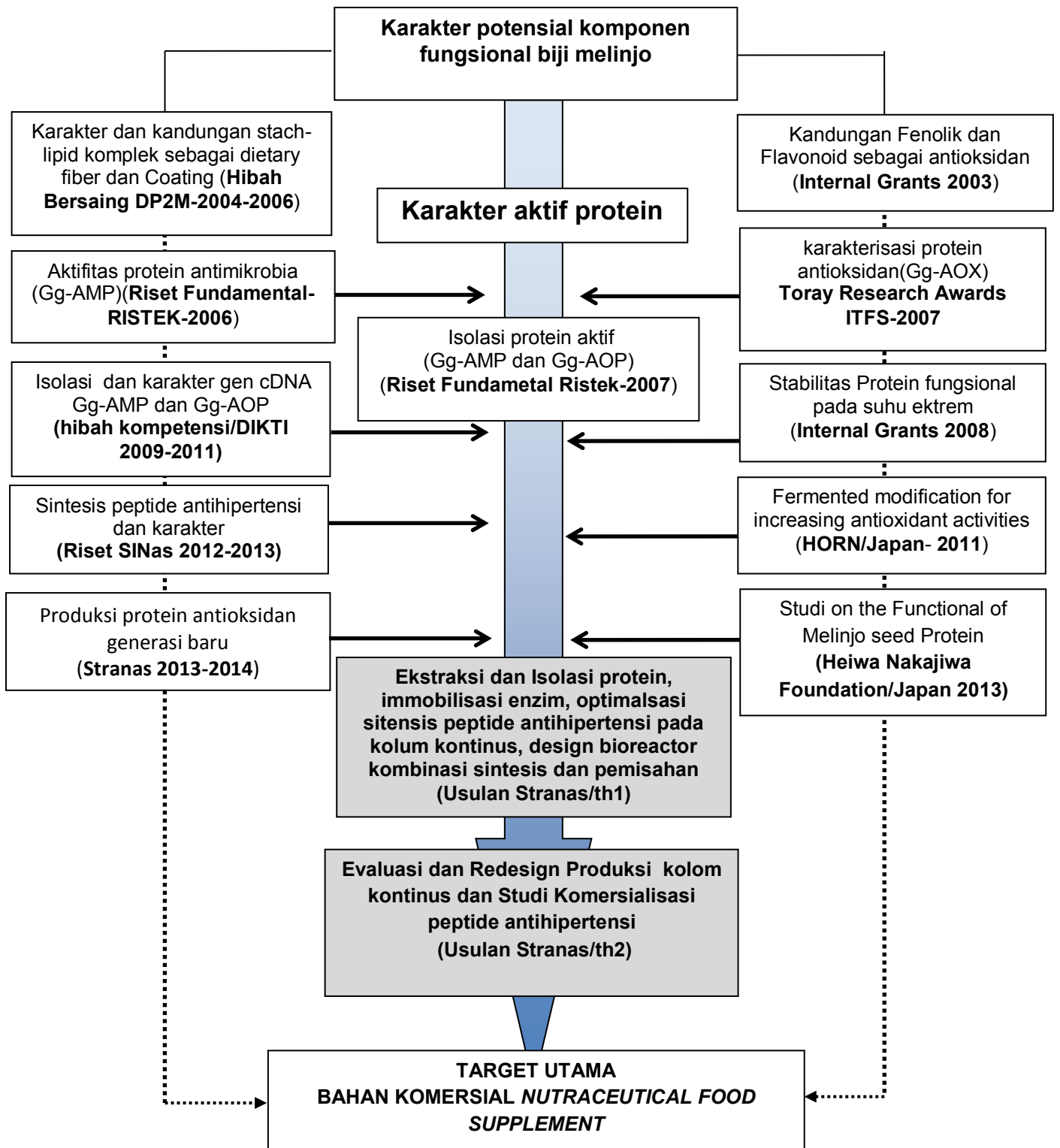
Potensi aktifitas antioksidan dan total kandungan phenolik pada jaringan tanaman melinjo seperti akar, batang, daun, biji dan kulit biji juga dipelajari. Total phenolik pada jaringan sangat bervariasi antara 5.97 and 9.91 mg GAE g⁻¹, sedangkan kandungan flavonoik antara 0.85 – 3.14 mg QE g⁻¹. Tingginya aktivitas radical scavenging ditemukan pada jaringan akar dengan kisaran 37.27 mg VCEAC g⁻¹ sampel. Lebih lanjut, tingkatan aktifitas radical scavenging pada beberapa jenis jaringan sebagai berikut: akar (37.27 mg VCEAC) >daun (36.66 mg VCEAC) > biji (34.08 mg VCEAC)> batang (32.52 mg VCEAC)>kulit biji (32.48 mg VCEAC). Kandungan phenolik/flavonoik yang tinggi mengindikasikan adanya potensi tinggi sebagai radical scavenging (**Siswoyo et al, 2013, Journal of Medical Plant Research**).

Isolasi dan pemurnian protein biji melinjo telah dilakukan dengan menggunakan teknik kombinasi kolom kromatografi seperti ion exchange dan gel filtration merupakan langkah pertama dalam usaha untuk dapat mengidentifikasi dan mengkarakter potensi aktifitas protein sebagai antioxidant, free radical-scavenging dan antimikrobia. Sebagiaian besar protein biji melinjo didominasi oleh protein dengan berat molekul sebesar 30 dan 12 kD (**Siswoyo et al., 2007, 19th FAOBMB Seoul Conference**) berdasarkan analisis menggunakan MALDI-TOF-MS dinyatakan keduanya protein tersebut adalah jenis baru (**Siswoyo et al., 2011, Journal of Agricultural and Food Chemistry**) dan mempunyai karakter relative lebih stabil pada suhu tinggi jika dikombinasikan dengan NaCl (**Siswoyo, 2006, Jurnal Teknologi & Industri Pangan, (17) 3:214-220**). Selanjutnya, 2 jenis protein hasil pemurnian menunjukkan protein dengan berat molekul 30 kDa mempunyai potensi antioksidan lebih besar daripada protein dengan berat molekul 12 kDa. (**Siswoyo et**

al., 2011, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*). Aktivitas akan meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi protein yang ditambahkan. Aktivitas antioksidan protein ini mempunyai kemampuan yang sama dengan aktifitas BHT pada sistem pengujian emulsi asam linoleic. Dua Jenis protein ini juga menunjukkan potensi sebagai scavenging melawan free radicals seperti DPPH dan superoxide radicals serta kemampuan mereduksi dan mengikat Fe^{2+} dengan kuat. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa protein biji melinjo sangat berpotensi sebagai sumber antioxidant (**Siswoyo, 2007, Toray Research Awards, ITSF; Siswoyo et al., 2011, Journal of Agricultural and Food Chemistry**). Lebih lanjut, pengujian potensi protein biji melinjo sebagai antibakteri dan antifungal juga dilakukan. Pengujian dengan menggunakan disk diffusion dan pengukuran turbidity menunjukkan protein biji melinjo sangat efektif menghambat beberapa jenis jamur dan bakteri baik gram negative atau positif seperti *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* *Escherichia coli* and *Salmonella thypi* (**International Seminar Advance in Biological Science, 2007**).

Dari informasi penting yang diperoleh dalam kegiatan penelitian sebelumnya tentang potensi yang dimiliki oleh protein antioksidan (AOP) dari biji melinjo sebagai sumber genetik protein fungsional maka tujuan utama penelitian yang akan dilakukan adalah pengembangan teknologi modifikasi protein Gg-AOP dari biji melinjo untuk memperoleh protein antioksidan generasi baru yang mempunyai tingkat aktivitas yang lebih tinggi, hal tersebut penting artinya untuk melakukan produksi protein fungsional generasi baru sebagai bahan dasar pembuatan *nutraceutical food supplement* secara alami dan cepat (**Lihat Gambar 1**).

PENGEMBANGAN PROTEIN FUNGSIONAL DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*) SEBAGAI BAHAN KOMERSIAL NUTRACEUTICAL FOOD SUPPLEMENT



Gambar 1. Diagram Peta Jalan Penelitian

Penelitian ini akan diracangkan untuk dilakukan selama 2 tahun, **Tahun I (2014)**: Untuk mencapai 1) Ekstraksi dan isolasi protein kasar; ekstraksi sample dilakukan berdasarkan metode yang disebutkan dalam Dawson *et al.*, dalam Deutscher (1990), dilanjutkan dengan tahap isolasi dengan menggunakan metode isoelektrik presipitasi. 2) immobilisasi enzim dalam reactor dilakukan dengan menggunakan metode Sol-Gel Immobilized enzim yang disebutkan oleh Corici *et al.* (2011). Enzim alcalase di immobilisasi menggunakan beberapa campuran bahan pembawa silane precursors (DMDMOS/TMOS, 1:1) yang mengandung PEG 20.000, NAF dan isopropyl alcohol. Setelah polimerisasi terjadi alcalase gel dikeringkan dalam ruangan dan selanjutnya di packing dalam kolom secara bertahap dengan perantara ammonium Carbamate. Optimasi reaksi dalam kolom sintesis untuk memperoleh peptide generasi baru dilakukan pada konsentrasi protein isolate sebagai bahan sintesis, dan waktu serta volume feeding, evaluasi dilakukan dengan mengukur jumlah peptide yang terbentuk dengan menggunakan metode TNBS dan HPLC. 3) design bioreaktor dengan prinsip kombinasi **metode sol-gel immobilized enzyme** pada sistem kolom kontinu dan metode *“Electric field membrane filtration”* serta pengujian efektifitas produksi dalam produksi peptida aktif yg mempunyai aktivitas antihipertensi tinggi; Karakterisasi optimalisasi reaksi dilakukan dengan mengamati. Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan asam trinitrobenzenesulphonic (TNBS) (Alder-Nissen, 1979), dan prosedur ini diadopsi dari Thiansilakul *et al.*, (2007). Penentuan berat molekulnya dengan elektroforesis sesuai dengan metode Laemmli (Cooper dalam Deutscher, 1990), dengan konsentrasi 15% SDS-PAGE dan HPLC (Siswoyo *et al.*, 2013). Sedangkan aktivitas antihipertensi dilakukan dengan menggunakan menggunakan ACE Kit-WST (Le Hong *et al.*, 2007).

BAB III. METODE PENELITIAN

Tahun I tahap 1

3.1 Preparasi Protein Isolates

Sampel (15 gram) dihaluskan dengan menggunakan mortir. Kemudian ditambahkan 15 mL 10mM Tris HCl pH 7. Ekstrak sampel di pusingkan dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4⁰C selama 20 menit. Protein hasil ekstraksi

dipresipitasikan dengan menambahkan Amonium sulfat dengan konsentrasi kejenuhan 0-30% (*Final concentration of ammonium sulfate : Percentage saturation*) (Dawson *et al.*, dalam Deutscher, 1990). Selanjutnya protein di pusingkan dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit dan protein yang terpresipitasi di dialisis selama 24 jam. Selanjutnya fraksi ini digunakan sebagai bahan untuk melakukan isolasi menggunakan metode isoelektrik

Protein kasar hasil dari ekstraksi sebelumnya dilarutkan dalam aquades (10% b / v) dan pH diatur pada kisaran 7,8-9,2 dengan menambahkan 1 N NaOH. Suspensi itu diaduk selama 2 jam pada 4°C dan kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada 10.000 rpm pada suhu 4° C. Selanjutnya supernatant diatur pH 4,3-5,7 dengan menggunakan 1 N HCl untuk dapat mengpresipitasi protein, dan kemudian suspensi dibiarkan pada suhu 4 ° C semalam untuk memungkinkan protein dapat terendapkan secara sempurna, setelah itu, larutan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada 4°C. Endapan protein (PI-Gg-AH) yang diperoleh diresuspended dengan aquadest dan dikering dengan cara pembekuan kering dan kemudian sampel disimpan pada -20 ° C sampai digunakan lebih lanjut.

3.2 Immobilisasi dan optimalisasi reaksi

Immobilisasi enzim dalam reactor dilakukan dengan menggunakan metode Sol-Gel Immobilized enzim yang disebutkan oleh Corici *et al.* (2011). Enzim *alcalase* di immobilisasi menggunakan beberapa campuran bahan pembawa silane precursors (DMDMOS/TMOS, 1:1) yang mengandung PEG 20.000, NAF dan isopropyl alcohol. Setelah polimerisasi terjadi *alcalase* gel dikeringkan dalam ruangan dan selanjutnya di packing dalam kolom secara bertahap dengan perantara ammonium Carbamate.

Optimasi reaksi dalam kolom sintesis untuk memperoleh peptide generasi baru dilakukan pada konsentrasi protein isolate sebagai bahan sintesis, dan waktu serta volume feeding.

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan asam trinitrobenzenesulphonic (TNBS) (Alder-Nissen, 1979), dan prosedur ini diadopsi dari Thiansilakul *et al.*, (2007). Asam α -amino Jumlah ditentukan dalam sampel di hidrolisis secara asam (6 M HCl pada 100°C selama 24 jam) dan asam α -amino larut diukur pada awal dan akhir enzimatis reaksi. Protein yang diperoleh kemudian

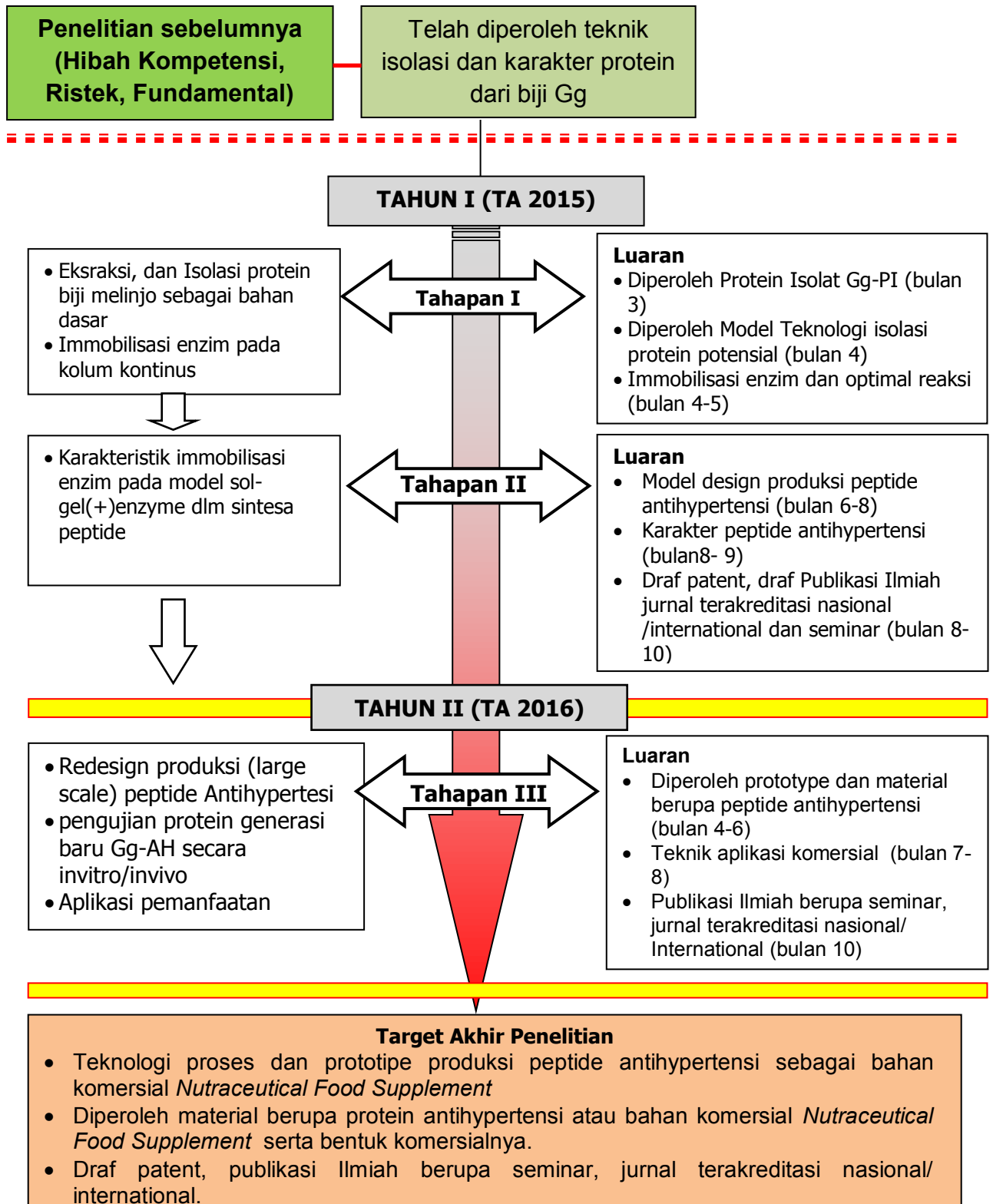
ditentukan berat molekulnya dengan elektroforesis sesuai dengan metode Laemmli (Cooper dalam Deutscher, 1990), dengan konsentrasi 15% SDS-PAGE.

3.3 HPLC Analisis

Perubahan atau distribusi berat molekular protein setelah dan sesudah dihidrolisis diamati menggunakan HPLC dengan kolom Cadenza CD-C18 150x46 mm dengan gradient konsentrasi larutan A: 5% CH₃CN (1% TFA) dan larutan B: 90% CH₃CN (0.07% TFA), kecepatan larutan 0.5 ml/min, kondisi kolom pada suhu 40°C.

Luaran Tahun 1 (2015): 1) Model teknologi isolasi dan ekstraksi protein aktif potensial dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*) (**bln ke 3**); 2) Protein Isolat dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*) sebagai bahan dasar (**bln ke 4**); 3) immobilisasi dan optimalisasi reaksi (**bln ke 4-5**); 5) design biorektor kolom kontinu (Model design) (**bln ke 6-8**); 4) pengujian dan optimalisasi reaksi dalam reactor kolom kontinu **bln ke 8-9**. 5) penulisan draf paten, seminar dan publikasi (**bln ke 6-10**).

Alur kerja untuk tiap tahunnya serta target yang akan diperoleh pada akhir penelitian dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Tahapan dan luaran tiap kegiatan

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi Protein (Gg-PI) dari biji melinjo

Bahan baku yang yang digunakan adalah biji melinjo berwarna merah penuh yang diperoleh dari daerah Jember. Kulit biji melinjo dihilangkan dan biji dikering pada oven dengan suhu 40°C selama 18 jam. Biji kering dihilangkan lapisan ke 2 secara manual. Biji kering lapisan 3 dihancurkan menjadi serbuk, kemudian disaring dengan menggunakan penyaring berukuran 100 mesh. Lemak pada tepung biji melinjo (50 gram) dihilangkan secara reflux dengan menggunakan n-Hexane dengan perbandingan 1:5 selama 3 jam diulang sebanyak 3 kali. Setelah dikeringkan angin, serbuk biji melinjo dilarutkan menggunakan air distilasi yang sudah diatur pHnya antara 8-9 dengan menggunakan 2 N NaOH. Bahan yang tidak larut disahkan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Bagian terlarut dipisahkan dan selanjutnya di atur pH antara 8-9. Dilakukan lagi pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 pada suhu 4°C diperoleh protein sebanyak 1674.16 mg dengan aktifitas antioksidan sebesar 0.035 VCEAC/mg.



Gambar 3. A. Tahapan freeze dried protein isolate, B. Hasil protein isolate
C. Profile SDS PAGE protein isolate

Protein yang dihasilkan dipresipitasikan dengan mengatur pH 4 menggunakan 1 N HCl, kemudian dibiarkan untuk mengendap pada suhu 4°C selama 24 jam dan selanjutnya dilakukan pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Hasil endapan yang diperoleh dicuci 3 kali dengan air distilat pH 4. Protein yang terendapkan dilarutkan dengan air distilat dan diatur pH sampai 8 dengan menggunakan 2 N NaOH. Protein yang diperoleh di keringkan dengan (*freeze dried*). Tahap terakhir protein yang diperoleh sebesar 400.10 mg dengan aktivitas antioksidan sebesar 0.736 ± 0.008 mgVCEAC/ mg protein (Gambar 3).

4.2 Karakterisasi protein Isolate

Komposisi asam amino protein isolate dari melinjo didominasi oleh aspartic acid (Asp) dan glutamic acid (Glu) seperti terlihat di Tabel 1.

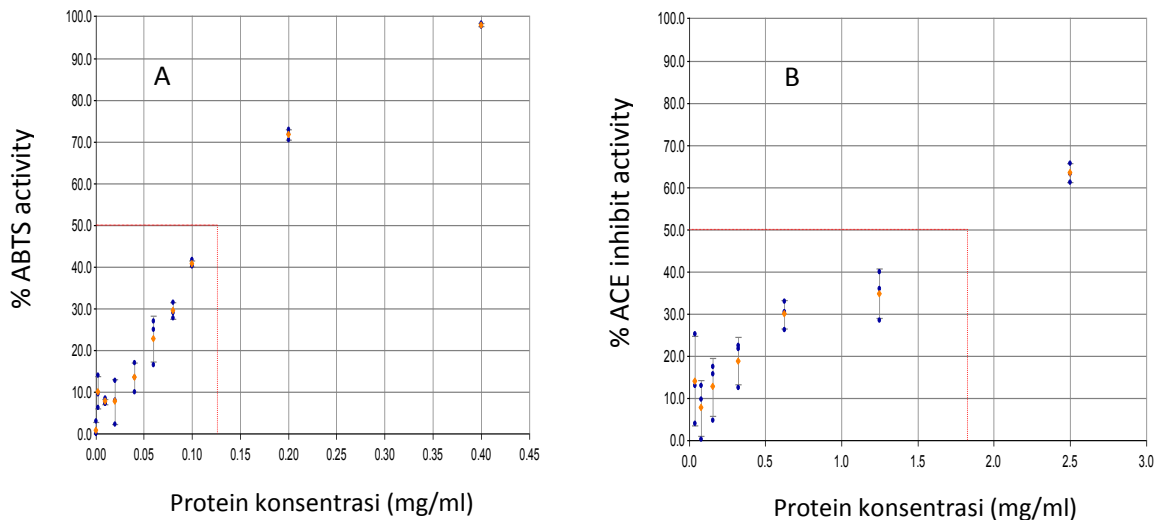
Tabel 1. Asam Amino komposisi dari protein isolate dari biji melinjo*

Amino Acid	Gg-PI
Aspartic Acid (Asp)	12.830
Threonine (Thr)	7.141
Serin (Ser)	7.825
Glutamic Acid (Glu)	12.813
Proline (Pro)	2.398
Glycine (Gly)	8.909
Alanine (Ala)	6.542
Cysteine (Cys)	0.147
Valine (Val)	8.449
Methione (Met)	0.516
Isoleucine (Ile)	4.799
Leucine (Leu)	8.512
Tyrosine (Tyr)	5.716
Phenylalanine (Phe)	1.863
Histidine (His)	0.516
Lysine (Lys)	6.392
Arginine (Arg)	2.854

% mole base

Evaluasi kemampuan ACE inhibitor dilakukan dengan menggunakan ACE Kit-WST (Le Hong *et al.*, 2007) dan metode ABTS untuk melihat kemampuan antioksidannya dan juga sebagai pembanding terhadap aktivitas ACE inhibitor. Pada Gambar 4, Dari gambar tersebut terlihat bahwa tingkat aktivitas ACE inhibitor dari Gg-PI sangatlah rendah jika dibandingkan dengan beberapa jenis protein yang lain

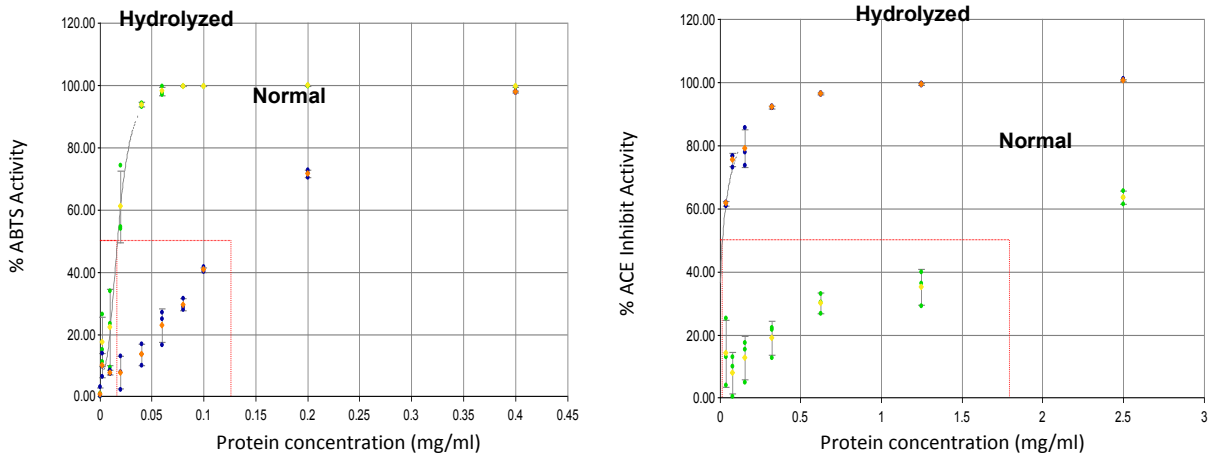
seperti pada protein kedelai dengan EC50 sebesar 1.798 mg/ml. Aktivitas ACE inhibitor meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi protein yang diujikann begitupula dengan aktivitas antioksidan/ aktivitas ABTS meningkat dengan meningkatnya jumlah protein yang ditambahkan sampai mendekati 100% tereduksi pada konsentrasi sebesar 0.40 mg/ml dengan EC50 0.127 mg/ml.



Gambar 4. ABTS (A) dan ACE inhibitory (B) aktivitas protein Isolat (Gg-PI).

4.3 Karakter protein ACE Inhibitor (Gg-AH)

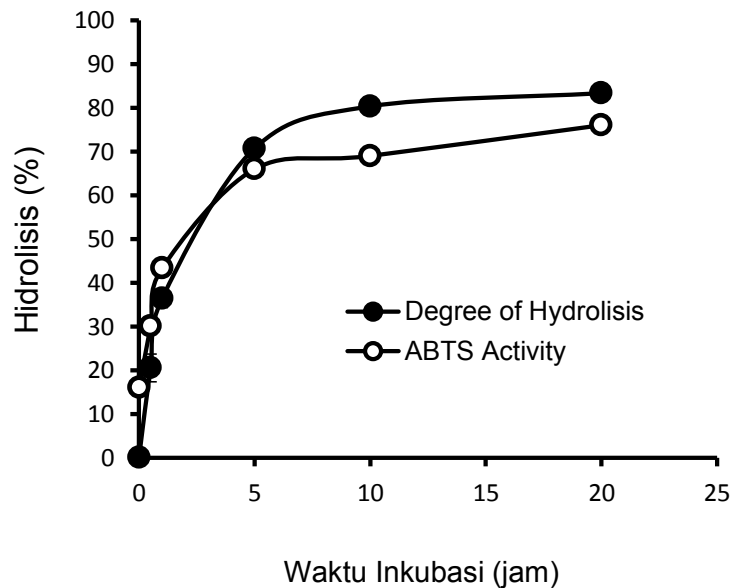
Evaluasi kemampuan ACE inhibitor dilakukan dengan menggunakan aktivitas ACE inhibitor dan metode ABTS untuk melihat kemampuan antioksidannya dan juga sebagai pembandingan terhadap aktivitas ACE inhibitor. Pada Gambar 4, dari gambar tersebut terlihat bahwa pengaruh hidrolisis terhadap tingkat aktivitas ACE inhibitor dari Gg-PI hidrolisis. Aktivitas ACE inhibitor secara cepat terjadi peningkatan pada konsentrasi 0.1 mg/ml dan meningkat secara maksimum sampai pada konsentrasi 1.5 mg/ml begitu pula dengan aktivitas ABTS dan akan sangat menyolok jika dibandingkan dengan protein isolate non hidrolisis (normal), kurang lebih 10 kali lipat lebih dengan EC50 0.016 mg/ml untuk PI-hydrolyzed dan 1.798 mg/ml untuk PI-unhydrolyzed.



Gambar 5. Analisis aktivitas protein hidrolisis (alcalase) menggunakan metode ABTS dan ACE inhibitor.

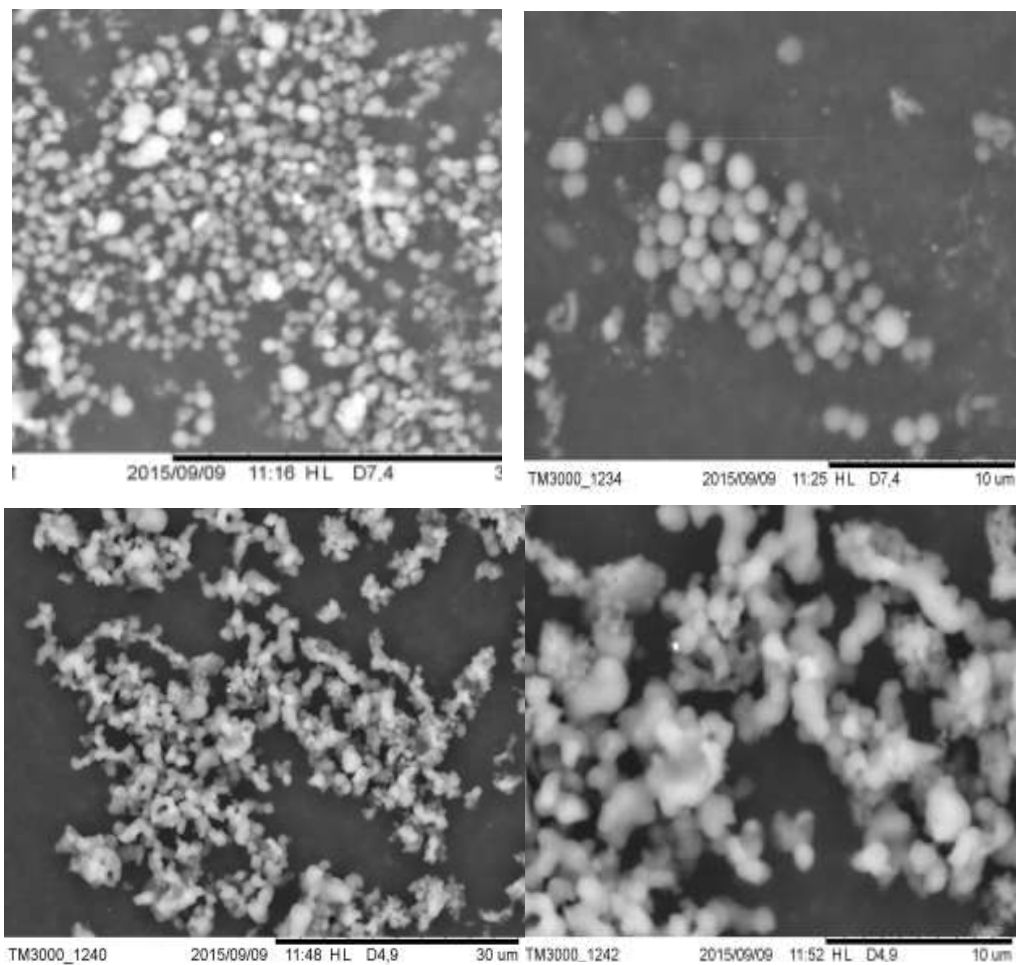
4.4 Karakterisasi Immobilized

Immobilisasi enzim dilakukan dengan menggunakan metode Sol-Gel Immobilized enzim yang disebutkan oleh Corici *et al.* (2011). Enzim alcalse di immobilisasi menggunakan beberapa campuran bahan pembawa silane precursors (DMDMOS/TMOS, 1:1) yang mengandung PEG20.000, NAF dan isopropyl alchcohol. Setelah polimerisasi terjadi alcalse gel dikeringkan dalam ruangan dan selanjutnya di packing dalam kolum secara bertahap dengan perantara ammonium Carbamate.



Gambar 6. Kemampuan hidrolisis enzim yang immobilisasi pada sistem sol-gel.

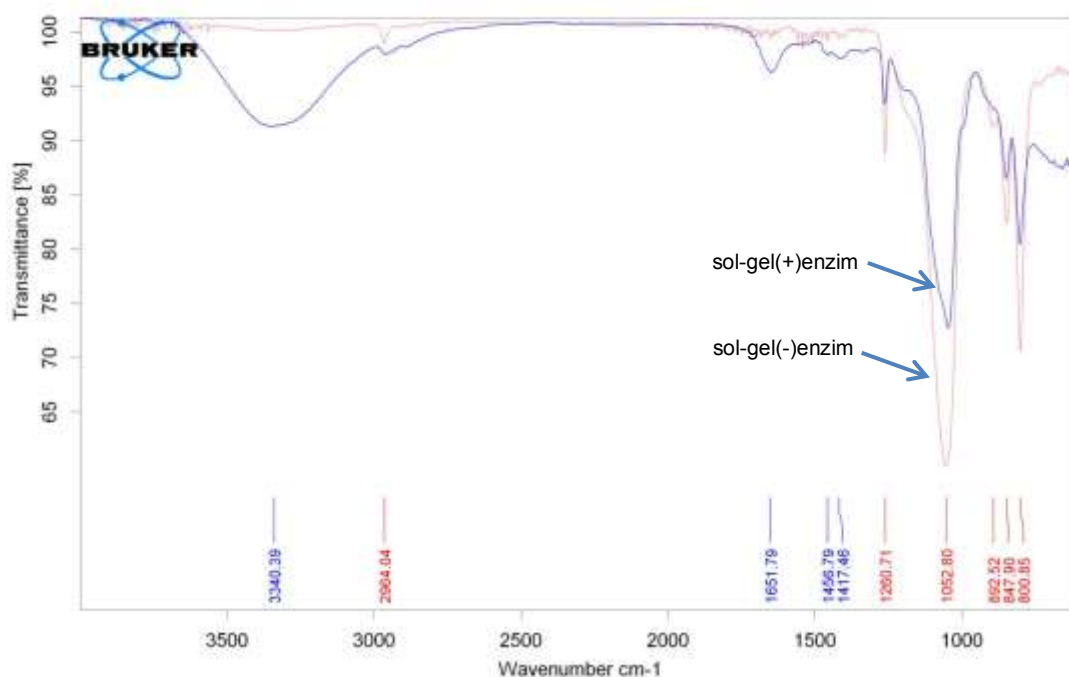
Kemampuan hidrolisis menggunakan immobilisasi enzim (sol-gel+enzim) menunjukkan kemampuan untuk menghidrolisis secara baik seiring dengan peningkatan waktu inkubasi dengan ditandai dengan meningkatnya jumlah asam amino yang terlepas (Gambar 6). Sebagai indikator awal terhadap efektifitas dalam hidrolisis, protein yang terhidrolisis diukur kemampuan aktioksidannya dengan menggunakan metode ABTS. Pada Gambar 6 menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan berdasarkan tingkat pengujian menggunakan metode ABTS. Dari gambar tersebut terlihat bahwa pengaruh hidrolisis dapat meningkatkan kemampuan antioksidan secara cepat sampai waktu 6 jam dan meningkat secara graduate sampai 24 jam. Peningkatan konsentrasi protein hidrolisis akan meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi jumlah protein hidrolisis.



Gambar 7. SEM photogram sol-gel-enzim. A sol-gel (3000x); B. Sol-gel (6000x); C. Sol-gel-enzim (2500x) dan D. Sol-gel-enzim (6000x).

SEM photogram analisis immobilized enzim dapat dilihat pada Gambar 7. Perbandingan antara bentuk fisik dari hasil antara sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+enzim sangat berbeda dimana pada sol-gel(-)enzim terlihat berbentuk granular elips berpisah (A) sedang pada sol-gel(-)enzim berbentuk spherical bulat tidak beraturan dan saling terikat (B). Diameter rata rata antara 0.5-1.5 μm untuk sol-gel(-)enzim dan 1.0 - 2.0 μm sol-gel(+enzim).

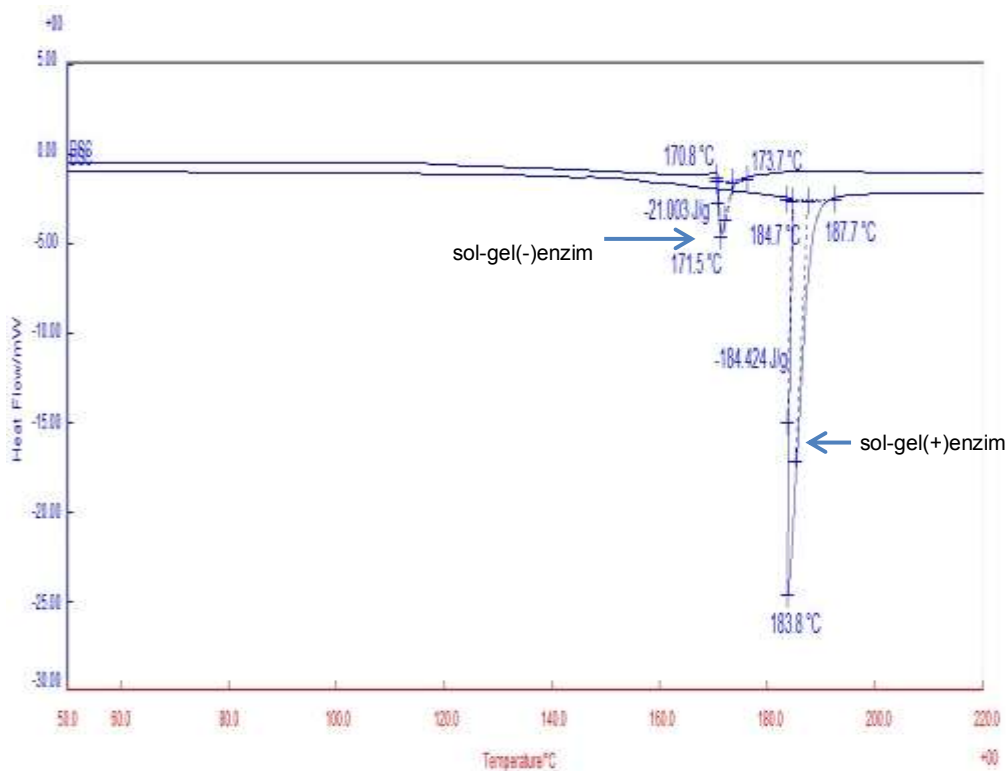
FTIR spectra sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+enzim dapat dilihat dari Gambar 7. Immobilisasi enzim sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+enzim menunjukkan broad band antara 3,000 dan 3,700/cm, dimana menunjukkan O-H stretching vibrations dan 1.260.71/cm menunjukkan carbonyl group. Dan sol-gel(-)enzim band ditunjukkan band yang kuat pada panjang gelombang 1,052.8/cm menunjukkan C-O stretching vibrations. Perbedaan ini menunjukkan adanya suatu binding antara sol-gel matrik dengan protein (enzim).



Gambar 8. Spektrum FTIR dari sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+enzim

Untuk mengetahui karakter termal dari sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+enzim dilakukan analisis thermal dengan menggunakan DSC pada Gambar 9. Dari gambar

tersebut ditemukan peningkatan titik puncak dari 171°C (Sol-gel(-)enzim) menjadi 183.7 °C (Sol-gel(+enzim) yang diikuti dengan peningkatan enthalpi dari 21 J/g menjadi 184.4 J/g. Ini menunjukkan bahwa terjadi suatu ikatan khusus antara sol-gel matrik dengan enzim, hal ini juga ditemukan pada beberapa hasil penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya [22, 25].

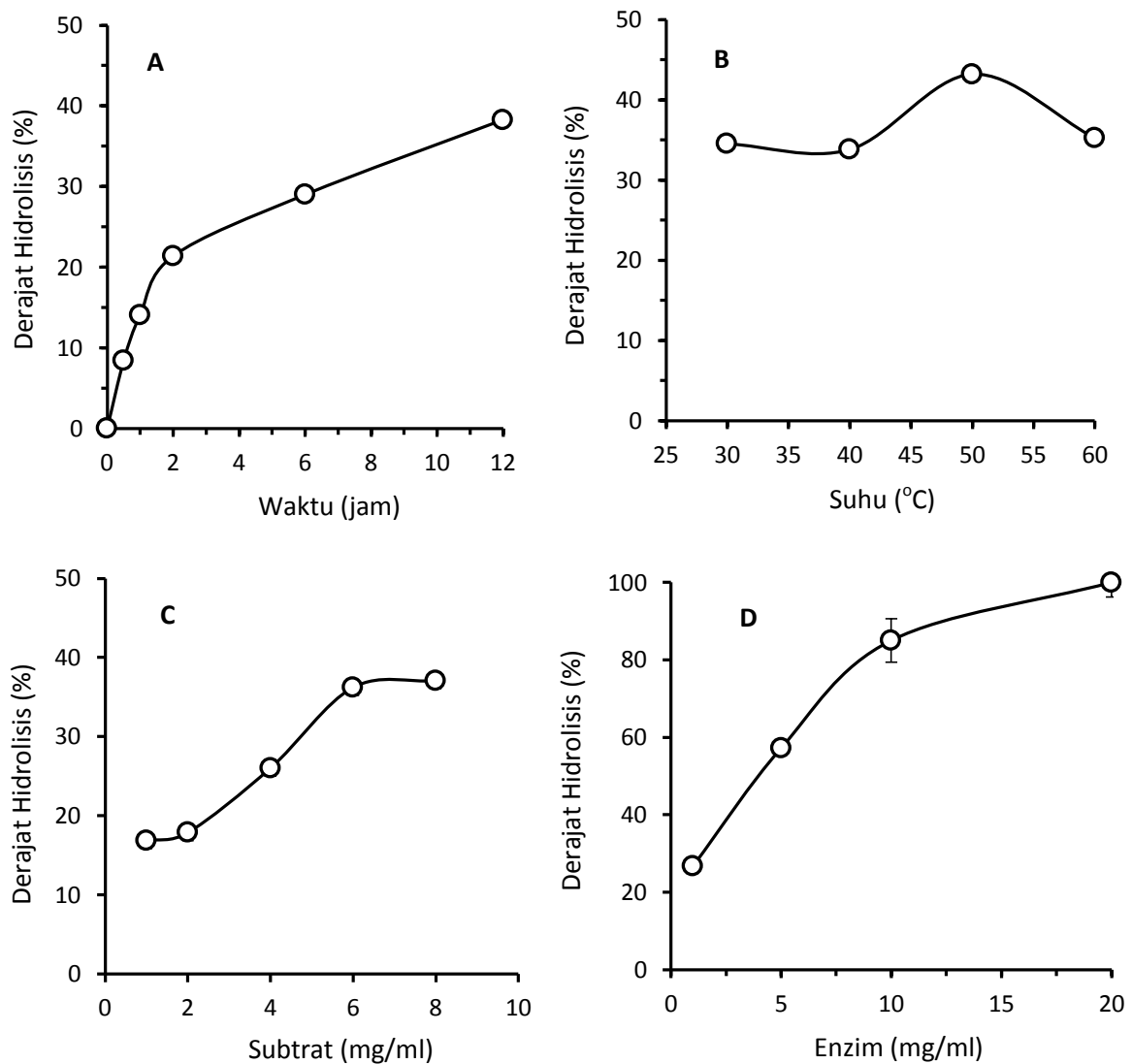


Gambar 9. DSC Thermograph dari sol-gel(-)enzim dan Sol-gel(+enzim

4.5 Optimalisasi hidrolisis menggunakan immobilisasi enzim

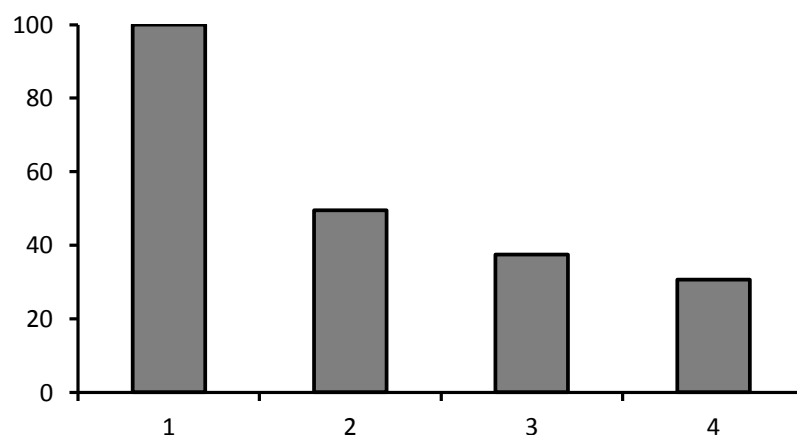
enzim alchalase yang terimobilisasi dalam sistem Sol-Gel (Sol-Gel(+enzim) digunakan dalam memproduksi peptida antihipertensi (Gg-AH). Standart hidrolisis untuk menghasilkan peptida (Gg-AH) menggunakan metode yang telah disebutkan sebelumnya (siswoyo *et al.*, 2014). Optimalisasi hidrolisis protein isolat dari biji melinjo dengan menggunakan immobilisasi alchalase (sol-gel+enzim) berdasarkan waktu inkubasi dapat dilihat pada **Gambar 10A**. Pada gambar tersebut menunjukkan perubahan hasil yang terus meningkat secara cepat antara 0-4 jam setelah itu produk yang dihasilkan mempunyai tendensi yang tetap sampai 6 jam inkubasi. Sedangkan pengaruh suhu terhadap hidrolisis terlihat antara suhu antara 45-55°C memberikan suhu optimal terhadap proses hidrolisis (**Gambar 10B**). Sedangkan

hasil hidrolisis dengan perlakuan jumlah substrat dengan jumlah 6 mg/ml mempunyai kecenderungan hasil hidrolisis yang tertinggi (**Gambar 10C**). Sedangkan jumlah enzim yang digunakan dalam hidrolisis mempunyai kecenderungan meningkatkan persen hidrolisis. Hidrolisis akan mengalami peningkatan dengan meningkatnya jumlah enzim. Pada konsentrasi lebih dari 10 mg enzim terdapat kecenderungan statis (**Gambar 10D**).



Gambar 10. Hidrolisis protein isolate biji melinjo berdasarkan berdasarkan waktu (A); suhu (B) dan jumlah substrat (C); dan jumlah enzim (D).

Untuk melihat efisiensi dalam penggunaan kembali (reuse) dari enzim yang telah diimmobilisasi (Sol-gel (+)enzim) dilakukan pengujian dengan melakukan hidrolisis pada kondisi optimal hidrolisis seperti yang tersebut sebelumnya. Pada Gambar 11. terlihat terjadi penurunan efisiensi dalam menghidrolisis PI hampir 50% pada saat penggunaan yang ke 2 dan menurun secara dratis pada penggunaan 3 dan ke 4. Atas dasar data diatas maka dilakukan optimalisasi model penggunaan jumlah enzim, jumlah substrat dan waktu inkubasi yang tepat berdasarkan jumlah substrat yang terhidrolisis dengan aktivitas ACE tertinggi dalam kisaran waktu yang terpendek. Evaluasi peningkatan produk protein Gg-AOP secara enzimatik merupakan dasar dalam peningkatan aktivitas antioksidan pada skala laboratorium. Modifikasi aktifitas antioksidan dilakukan dengan melakukan isolasi protein pada biji melinjo. Dengan melakukan pemilihan jenis peptidase efektif diharapkan memperoleh jenis peptide AOP yang tinggi aktivitasnya. Evaluasi penggunaan alcalase protein isolate dihidrolisis dengan variasi waktu inkubasi (Gambar 10A). Pada gambar tersebut terlihat pada waktu 4-5 jam alcalase mempunyai kemampuan yang tinggi dalam mendegradasi protein isolat yang disertai dengan peningkatan beberapa jenis peptide baru yang timbul (low molekul weight <3 KD).



Gambar 11. Reuse sol-gel(+)enzim dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo.

4.5 Optimalisasi hidrolisis menggunakan immobilisasi enzim

Produksi protein aktif Gg-AH dilakukan dengan menghidrolisis protein Gg-PI dengan menggunakan alcalase dengan perbandingan 0.2% (E/S) pada kondisi suhu

50°C pada pH 8 selama 3-4 jam diikuti dengan pengadukan secara kontinyu. Proses hidrolisis Gg-PI oleh alcalase menghasilkan produk berupa campuran peptida dan asam-asam amino (Gg-AOP) melalui pemecahan ikatan peptida. Inaktivasi enzim dilakukan melalui inkubasi hidrolisat pada suhu 80°C selama 15 min. Selanjutnya Gg-AOP yang terbentuk dipisahkan secara sederhana dengan sentrifugasi. Supernatan hidrolisat dipisahkan dengan cara pengeringan dingin hingga menjadi serbuk.

Proses pengeringan dingin dapat mengatasi perubahan karakteristik hidrolisat yang tidak diinginkan, mencegah terjadinya penyusutan padatan dengan mempertahankan bentuk dan dimensi aslinya, meningkatkan stabilitas selama penyimpanan, mencegah kehilangan flavor, dan menghambat pertumbuhan bakteri. Pengeringan 500 ml filtrat hidrolisat menghasilkan rendemen sebanyak 1,47% (b/v) setara 2,45 gram serbuk hidrolisat.

DAFTAR PUSTAKA

- ACE-kit WST. Manual instruction, Dojindo Molecular Technologies, Inc.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27:1256-1262.
- Bakri S, Suhardjono, J Djafar (2001) Hipertensi pada Keadaankeadaan Khusus, dalam S Suyono, Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, edisi ke-3, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran UniversitasIndonesia, Jakarta, 483-487.
- BAPENNAS, (2007). Peningkatan Akses Masyarakat terhadap layanan Kesehatan yang Berkualitas. [Http://www.bappenas.go.id](http://www.bappenas.go.id).
- De Lucca, A.J.(2000) Antifungal Peptides: Potential Candidates For The Treatment Of Fungal Infections. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, Vol. 9, No. 2, P. 273-299.
- Fischer M, Gruppen H, Piersma S, Kofod LV, Schols HA, Voragen AGJ. (2002) Aggregation of peptides during hydrolysis as a cause of reduced enzymatic extractability of soybean meal proteins. *J Agric Food Chem* 50(16):4512-9.
- Gray RJ, Bateman TM, Czer LS, (1985) Use of esmolol in hypertension after cardiac surgery. *Am J Cardiol.* 1985;56:49F-56F
- Hancock, R.E.W. (2000) Cationic Antimicrobial Peptides: Towards Clinical Applications. *Expert Opinion On Investigational Drugs*, Vol. 9, P. 1723-1729.
- Hirano K, Koide M. (2000). Peptide manufacture by protein hydrolysis. Japan: Taiyo Kagaku Co., Ltd. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2000004896 A2 11. 8 p.
- Iwaniak A., Minkiewicz P., (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci.Pol., Technol. Aliment.* 6 (3), 5-15.
- Korhonen H, Pihlanto A. (2003). Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Curr Pharm Des* 9(16):1297-308.
- Kumar V., Cortran R.S., Robbins S.L., (2003) Robbins basic Pathology. 7th Edition. Saunders. Philadelphia. Pp.960-969.

- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-605.
- Law M, Wald N, Morris J (2003). Lowering blood pressure to prevent myocardial infarction and stroke: a new preventive strategy. *Health Technol Assess* 7 (31): 1–94.
- Lee C, Lee J. (2000) Method for producing soybean protein hydrolysates using hydrochloric acid and catalyst. S. Korea: Repub. Korean Kongkae Taeho Kongbo KR 20000033747 A 15. June 2000.
- Marshall, S. H. (2003) Antimicrobial Peptides: A Natural Alternative To Chemical Antibiotics And a Potential For Applied Biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 271-284.
- Meisel H., Walsh D. J., Murray B., and FitzGerald R. J. (2006), ACE-inhibitory peptides. In: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease* (Mine Y. and Shahidi F., eds.). CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, pp. 269-305
- Nelson MR, McNeil JJ, Peeters A (2001). PBS/RPBS cost implications of trends and guideline recommendations in the pharmacological management of hypertension in Australia, 1994–1998. *Med J Aust* 174 (11): 565–8.
- Oktay M, Gülçin, Küfrevio (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm. Wissen. Technol.*, 36: 263-271.
- Selitrennikoff, C.P. (2001) Antifungal Proteins. *Applied And Environmental Microbiology*, 67: 2883- 2894.
- Setiawati A., (1995). Interaksi Obat. In: farmakologi dan Terapi. Edisi 4. Gaya Baru. Jakarta. Pp.800-810.
- Siswoyo, T.A , Aldino, Hosokawa K (2013) Free Radical Scavenging Activity and DNA damage protective effect of melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(32) 2399-2406.
- Siswoyo, T.A., Oktiviandari, P and Sugiharto, B (2007) Isolation and Characterization of free Radical Scavenging Activities Polypeptides from the Melinjo Seed (*Gnetum gnemon*). *International Conference of FAOMBM. Seoul, Republic of Korea*
- Siswoyo, T.A., Eka M., Lee K.O. and Hosokawa K. (2011) Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions From Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seed. *J. Agricultural and Food chemistry*. 59, 5648–5656.
- Stockley (2011) Drug-drug interaction, (Ed). Van Boxtel. B. santosa and ER Erdward. *Drug Benefits and Risk International Textbook of Clinical Pharmacology*. John Willy & Son Ltd.
- Wang, W. , E. Gonzalez de Mejia (2005) A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 4 (4), 63-68.
- Welling, M.M.; Paulusma-Annema, A.; Balter, H.S.; Pauwels, E.K. And Nibbering, P.H. (2000) Technetium-99m Labeled Anti-microbial Peptide Discriminate Between Bacterial Infection And Sterile Inflammations. *European Journal Of Nuclear Medicine*, Vol. 27, No. 3, P. 292-301.
- Wright JM, Musini VM (July 2009). Wright, James M. ed. "First-line drugs for hypertension". *Cochrane Database Syst Rev* 8 (3).
- WHO-ISH Hypertension Guideline Committee (2003). Guidelines of the management of hypertension. *J Hypertension*. 21(11): 1983-92.

Yamamoto N, Ejiri M, Mizuno S. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Curr Pharm Des* 9(16):1345–55.

Lampiran 1.

Submitted Patent

Deskripsi

METODE PRODUKSI PEPTIDA ANTIOKSIDAN GENERASI BARU DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*) SEBAGAI BAHAN NUTRACEUTICAL FOOD SUPPLEMENT

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu proses produksi peptida antioksidan generasi baru, lebih khusus lagi protein hidrolisate dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*), produk dan kegunaan sebagai bahan *Nutraceutical Food Supplement*.

Latar Belakang Invensi

Pemanfaatan sumber alami berupa protein fungsional mendapat perhatian khusus oleh para ahli, oleh karena banyak protein antioksidan yang ditemukan menunjukkan kemampuan pharmacologis lain sebagai antihipertensi, antimicrobial, antiinflamasi dan anticancer (Siswoyo, et al., 2011; Je et al., 2009). Sumber protein antioksidan telah banyak ditemukan diantaranya pada milk protein (lactoferrin), β -latoglobulin dan casein, protein kedelai, protein dari jenis jamur, egg albumen proteins dan egg yolk (phosvitin), jagung (zein), kentang (patatin), yam (dioscorin), (Iwami, 1997; Hou et al., 2011; Kouh et al., 1999; Liu, Han, Lee, Hsu, & Hou, 2003; Maheswari, Ramadoss, & Krishanaswamy, 1997; Rajalakshmi & Narasimhan, 1996; Satue-Gracia, Frankel, Rangavajhyala, & German, 2000; Zhao et al., 2001; Yuang et al., 2010).

Hasil penelurusan dokumen paten menunjukkan adanya penggunaan ekstrak dari bahan tumbuhan baik dari biji, buah

atau bagian tumbuhan sebagai sumber antioksidan seperti pada patent US5616323, March 31, 1991, "Cucumis melo protein extract with antioxidant activity and process for preparing it, cosmetic or pharmaceutical composition or food composition containing such an extract"; WIPO Patent WO 2011/152330A1, Dec 12, 2011, "soybean protein hydrolysate containing and use thereof"; US2011/0184146A1, Jul 28, 2011, "Antioxidant polypeptide and a process for isolation and purification of the same"; dan PAT-CN101589761, Dec 12, 2008, "Preparation method and application hen seed antioxidant peptide".

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*), adalah tanaman asli Indonesia termasuk tanaman purba dan banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji melinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya atau dibuat krupuk (emping) setelah digiling, dikeringkan dan digoreng.

Kandungan protein relatif sangat tinggi pada biji melinjo antara 9-10% sangat potensi sebagai sumber protein fungsional (Siswoyo et al., 2013). Produksi peptida antioksidan generasi baru dapat diperoleh dengan cara menghidrolis protein dari biji melinjo dengan menggunakan enzim Alclase 24L. Identifikasi protein hidrolisate diperoleh peptida dengan berat molekul dibawah 1 kDa dengan didominasi dengan berat molekul 800 Da berdasarkan hasil analisis menggunakan *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry* (maldi-TOF). Invensi oleh Siswoyo et al, 2013, International Conference of Asia Pasific Protein Association, Korea, 2014, menunjukkan protein hidrolisate biji melinjo mempunyai kemampuan aktivitas yang tinggi sebagai penangkap radikal bebas pada sistem DPPH (α, α -diphenyl- β -pirrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), penangkapan ion Cu^{2+} dan Fe^{2+} , dan sebagai

pelindung terhadap kerusakan DNA. Dengan demikian penemuan peptida dibawah 1 kDa tersebut pada protein hidrolisate dari biji melinjo membuktikan bahwa protein hidrolisate biji tersebut sangat berpotensi sebagai bahan *nutraceutical food supplement*.

Uraian Singkat Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu metode produksi peptida dari protein hidrolisate biji melinjo (*Gnetum gnemon*) yang meliputi langkah-langkah sebagai berikut: mengiling dan menepungkan biji melinjo, menghilangkan lemak pada tepung, melarutkan tepung pada air destilat yang diatur pH sampai 8-9 dengan menggunakan 2N NaOH, memisahkan larutan terlarut dengan tidak terlarut, mengatur pH sekitar 4 pada bagian terlarut dengan menggunakan 1N HCl, memisahkan bagian yang terendapkan dengan yang tidak terendapkan. Bagian yang terendapkan (protein isolate) dilarutkan dengan air distilat dan diatur pH sekitar 8 dengan menggunakan 2 N NaOH. Hidrolisis protein isolate dilakukan dengan menggunakan alcalase 2.4L berbandingan antara protein dan enzim 0,2 % (b/b) dengan waktu hidrolisis antara 2-4 jam dengan waktu optimal 3 jam pada suhu 40-55°C dengan suhu optimal 50°C. Aktivitas enzim dihentikan pada suhu 80°C selama 15 menit dilanjutkan dengan mengsentrifuse dengan kecepatan 5,000 rpm selama 10 menit pada suhu 20-25°C, selanjutnya protein hidrolisate dikeringkan dengan pendinginan (freeze dried) dan menghasilkan peptida berbentuk padatan halus.

Uraian Lengkap Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu metode produksi peptida generasi baru dari protein hidrolisate biji melinjo melalui beberapa tahapan. Bahan baku yang yang digunakan adalah biji melinjo berwarna merah penuh. Kulit biji melinjo dihilangkan dan biji dikeringkan pada oven dengan suhu 40°C

selama 18 jam. Biji kering dihilangkan lapisan ke 2 secara manual. Biji kering lapisan 3 dihancurkan menjadi serbuk, kemudian disaring dengan menggunakan penyaring berukuran 100 mesh. Lemak pada tepung biji melinjo (50 gram) dihilangkan secara *reflux* dengan menggunakan *n-Hexane* dengan perbandingan 1:5 selama 3 jam diulang sebanyak 3 kali. Setelah dikering anginkan, serbuk biji melinjo dilarutkan dengan menggunakan air distilasi yang sudah diatur pHnya antara 8-9 dengan menggunakan 2 N NaOH. Bahan yang tidak larut dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10,000 rpm selama 10 menit. Bagian terlarut dipisahkan dan selanjutnya di atur pH antara 8-9. Dilakukan lagi pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 10,000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C diperoleh protein sebanyak 1674,16 mg dengan aktifitas antioksidan sebesar 0,035 VCEAC/mg. Protein yang dihasilkan diendapkan dengan mengatur pH sekitar 4 menggunakan 1 N HCl, kemudian dibiarkan untuk mengendap pada suhu 4°C selama 24 jam dan selanjutnya dilakukan pemisahan dengan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 10,000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Protein yang terendapkan dilarutkan dengan air distilat dan diatur pH sekitar 8 dengan menggunakan 2N NaOH. Hidrolisis dilakukan dengan berbandingan antara protein dan enzim (alcalase 2.4L) 0,2 % (w/w) dengan waktu hidrolisis antara 2-4 jam dengan waktu optimal 3 jam pada suhu 40-55°C dengan suhu optimal 50°C. Aktivitas enzim dihentikan pada suhu 90°C selama 5 menit dilanjutkan dengan mengsentrifuse dengan kecepatan 5,000 rpm selama 10 menit pada suhu 20-25°C. Protein hidrolisate selanjutnya dikeringkan dengan pendinginan (*freeze dried*).

Pada akhir hidrolisis diperoleh beberapa jenis peptida dengan berat molekul dibawah 1 kDa (MALDI TOF-MS). Rendemen akhir yang diperoleh 1,47% atau setara 2,45 gram padatan halus peptida dengan aktivitas sebesar 14,46 TAEC (mM).

Komposisi asam amino dari protein isolate biji melinjo dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi asam amino protein isolate dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*)

Amino Acid	Molekul (%)
Aspartic Acid (Asp)	12,83
Threonine (Thr)	7,14
Serin (Ser)	7,83
Glutamic Acid (Glu)	12,81
Proline (Pro)	2,40
Glycine (Gly)	8,91
Alanine (Ala)	6,54
Cysteine (Cys)	0,15
Valine (Val)	8,45
Methione (Met)	0,52
Isoleucine (Ile)	4,80
Leucine (Leu)	8,51
Tyrosine (Tyr)	5,72
Phenylalanine (Phe)	1,86
Histidine (His)	0,52
Lysine (Lys)	6,39
Arginine (Arg)	2,85
Tryptophan (Trp)	1,38

Klaim

1. Suatu metode produksi peptida antioksidan dari biji melinjo meliputi langkah-langkah berikut:

- a) Mengeringkan dan menepungkan biji melinjo (*Gnetum gnemon*)
- b) Menghilangkan lemak pada tepung biji melinjo;
- c) Melarutkan tepung dengan air distilat dan diatur pH sekitar 8 dengan menggunakan 2N NaOH;
- d) Memisahkan bagian tepung yang terlarut dengan tidak terlarut;
- e) Mengatur pH sekitar 4 pada bagian terlarut dengan menggunakan 1N HCl;
- f) Memisahkan bagian terlarut dengan yang tidak terlarut;
- g) Mengencerkan bagian tidak terlarut (protein isolate) dengan air distilat yang telah diatur pH sekitar 8; dan
- h) Menghidrolisis protein isolate menggunakan enzim Alchalse 24L 0.2% (b/b) dengan waktu hidrolisis antara 2-4 jam dengan waktu optimal 3 jam pada suhu 40-55°C dengan suhu optimal 50°C;
- i) Menghentikan proses hidrolisis pada suhu 80°C selama 15 menit;
- j) Memisahkan bagian terendapkan dengan yang tidak terendapkan;
- k) Mengeringkan bagian yang tidak terendapkan dengan cara pendinginan (*freeze dried*) dan diperoleh padatan halus protein hidrolisate.

2. Padatan halus protein hidrolisate yang dihasilkan sebagaimana dinyatakan pada klaim 1, mengandung peptida generasi baru dengan berat molekul dibawah 1 kDa sebesar 2,45 gram dengan aktivitas antioksidan sebesar 14,46 TAEC (mM) .

3. Padatan halus protein hidrolisate yang dihasilkan sebagaimana yang dinyatakan pada klaim 1 dapat digunakan sebagai bahan baku untuk *nutraceutical food supplement*.

Abstrak

METODA PRODUKSI PEPTIDA ANTIOKSIDAN GENERASI BARU DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*) SEBAGAI BAHAN NUTRACEUTICAL FOOD SUPPLEMENT

4. Invensi ini berhubungan dengan suatu metoda produksi peptida antioksidan generasi baru, lebih khusus lagi protein hidrolisate yang dibuat dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*) yang dikeringkan, digiling dan ditepungkan. Tepung melinjo dihilangkan lemaknya dengan cara reflux menggunakan n-heksan. Bahan setelah dikering anginkan kemudian diekstraksi menggunakan air distilat pada suhu ruang selama 24 jam. Proses produksi dengan menghidrolisis protein isolate menggunakan alcalase 2.4L menghasilkan peptida generasi baru dengan berat molekul dibawah 1 kDa berupa padatan halus dengan peningkatan aktivitas antioksidan sebesar 14,46 TAEC (mM). Padatan halus peptida tersebut dapat digunakan sebagai bahan baku *nutraceutical food supplement*.

Lampiran 2. Seminar International



Lampiran 3. Submitted International Journal



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Agriculture and Agricultural Science Procedia 00 (2015) 000–000

Agriculture and Agricultural Science

Procedia

www.elsevier.com/locate/procedia

International Conference on Food, Agriculture and Natural Resources, IC-FANRes 2015

Synthesis of Antioxidant Peptide Using Sol-Gel Immobilized Alcalase

Tri Agus SISWOYO*,

**Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)
and Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember, Indonesia*

**Second affiliation, Address, City and Postcode, Country*

Abstract

Alcalase 2.4L FG, a commercial proteases was physically entrapped in glass sol-gel matrices using alkoxyxilanes of different types mixed with tetramethoxysilane (TMOS). The materials were used for catalyzing C-terminal amidation of Z-Ala-Phe-OMe in batch reaction. Immobilization of protease has been achieved by the sol-gel method, using dimethyldimethoxysilane (DMDMOS) and tetramethoxysilane (TMOS) as precursors. In batch production, about 50% of degree hydrolysis was obtained at 40°C after 24 hours of incubation. Reproducibility of different batches of commercial Alcalase 2.4 L FG preparations was also investigated by evaluating the hydrolysis activity and the entrapment yields in the case of immobilization. The immobilized enzyme retained the initial activity over 4 cycles of repeated use in batch reaction at ambient temperature. The product contained about 39% hydrolysis by product.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V.
Peer-review under responsibility of the organizing committee of IC-FANRes 2015.

Keywords: Hydrolysis, Immobilization, Alcalase, Antioxidant

* Corresponding author. Tel: +62-331-321825; fax: +62-331-321825.
E-mail address: triagus.faperta@unej.ac.id

2210-7843 © 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V.
Peer-review under responsibility of the organizing committee of IC-FANRes 2015.

1. Introduction

Proteases represent a class of enzymes of emerging interest, used as catalysts for the cleavage of proteins (James et al., 1996; Yoshimaru et al., 1997) and synthesis and modification of peptides (Sangeetha et al., 2008). For such reactions it is often desirable to use organic media, so the operational stability of proteases under these conditions is important. To improve the enzyme stability in organic media, various methods of immobilization have been developed, such as physical adsorption of enzymes on a solid support (Bisht et al., 1997), encapsulating techniques using sol-gel method (Reetz et al., 2003), covalent binding through the appropriate groups (Ota et al., 2007; Xie et al., 1999). The immobilization of proteases on a solid support can offer several advantages over the free enzyme, including easy handling, recovery from the reaction medium, reuse and/or operation in continuous reactors (Ferreira et al., 2003). Sol-gels are a new class of materials that have been found to be suitable for the immobilization of enzymes and other biological molecules. Encapsulation of enzymes within sol-gel matrices could be more efficient compared to the other immobilization methods, considering the entrapment of larger amount of enzyme, thermal and chemical stability, simplicity of preparation without any covalent modification, and control of pore size (Sangeetha et al., 2008).

In this study, we tested Alcalase 2.4 L FG protease to catalyze the ammonolysis of Z-Ala-Phe-OMe, using ammonium carbonate as ammonium source. Enzyme entrapment in sol-gel matrices represents a mild technique, because the polymers are not toxic, and can even be used to entrap living cells. By using this immobilization method, it was intended to supply the enzyme with sufficient operational stability for continuous exploitation. The versatility of the obtained biocatalyst was investigated in the batch process, followed by utilization of sol-gel immobilized Alcalase 2.4 L FG in a packed-bed reactor, to obtain a continuous production of peptide amides.

2. Material and Method

2.1. Material

Alcalase 2.4 L FG was obtained from Novozyme, Silane precursors tetramethoxysilane (TMOS, 98%) and dimethyldimethoxysilane (DMDMOS, 96%) were products of Erika (Japan). The solvents were stored over 4-Å molecular sieves and used without further purification. All other common chemicals used were of analytical grade.

2.2. Preparation of Alcalase-Immobilized in Sol-Gel Matrices

The immobilization method [11] based on the Reetz procedure for the entrapment of lipases [7] has been used. Alcalase 2.4L FG solution batch (58 mg protein/mL) was used for immobilization. In a 10 mL glass vial, Alcalase solution (3.12 mL), PEG 20000 (0.8 mL), 1M NaF (0.4 mL), and isopropyl alcohol (0.8 mL) were mixed (magnetic stirring, 600 rpm). By continuous stirring, 24 μ moles silane precursors (DMDMOS/TMOS, molar ratio 1:1) were added. The resulting mixture was vigorously stirred at ambient temperature until the gel formation started. The gel was kept for 24 hours at 4°C in the refrigerator to complete polymerization and dried at ambient temperature for 48 hours. Finally, it was crushed in a mortar and kept in the refrigerator. The washing solutions were analyzed for protein content, and the activity of immobilized enzyme was determined using the hydrolysis reaction using NTBS method.

2.3. Fourier transform infrared (FTIR) measurements

FTIR spectra of Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)-enzyme were taken in the wavelength region between 400 and 4,000/cm at the ambient temperature with a Jasco FTIR-480 plus spectrometer (Japan).

2.4. Differential scanning calorimeter (DSC)

Thermal analyses were performed with DSC (Sapphire differential scanning calorimeter, PerkinElmer, Shelton, CT). The sample weights ranged from 3.0 to 9.0 mg. The samples were heated from 30 to 350°C at a heating rate of 100°C/min. The intercept points of the slopes were taken as the peak temperatures (T_p).

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM photographs were taken with JSM (Tokyo, Japan) 5600 scanning microscope to examine the morphology, surface structure and inside structure of Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)-enzyme at the required magnification at room temperature. The beads were deposited on brass hold and sputtered with a thin coat of gold under vacuum. Acceleration voltage used was 20 kV with the secondary electron image as a detector.

3. Result and Discussion

The Alcalase batches were immobilized twice under the same conditions, and tested for reproducibility of activity in the model reaction. The silane precursors used for immobilization were dimethyldimethoxysilane (DMDMOS) and tetramethoxysilane (TMOS) at a molar ratio of 1:1. Determination of the protein content in the water washing solutions revealed that between 70 and 73% of the enzyme has been immobilized, and the degree of immobilization had a standard deviation of 1.53%. Using these preparations, total conversion of the substrate protein isolate from melinjo was achieved within 24 hours, and the product contains about 95% of peptide. The percentage of peptide in the final product, as well as the total activity in the initial stage of the reaction, showed excellent reproducibility as well, with a standard deviation of 0.11% and 0.15%, respectively.

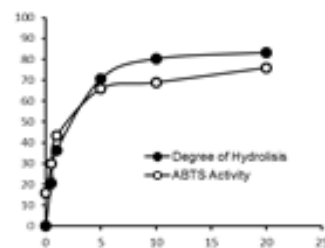


Fig. 1. Activity of sol-gel(+)enzyme during hydrolysis of protein isolate from melinjo seed.

The FTIR spectra of sol-gel(-)enzyme and sol-gel(+)-enzyme are shown in Fig. 2. They showed a broad band between 3,000 and 3,700/cm, which was attributed to O–H stretching vibrations. The strong band of sol-gel(+)-enzyme at 1,260.71/cm was assigned to the carbonyl group.

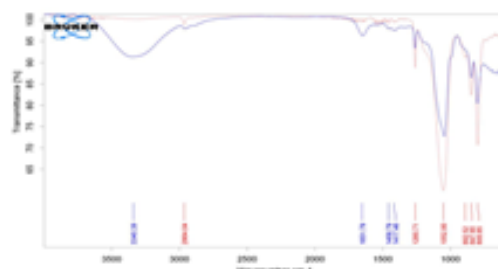


Fig. 2. FTIR spectra of Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)-enzyme

Sol-gel(+)enzyme showed one peaks at 1,052.8/cm and 1,294/cm due to C-N stretching, which confirmed the grafting of the monomer (Can, 2005; Chauhan et al., 2005).

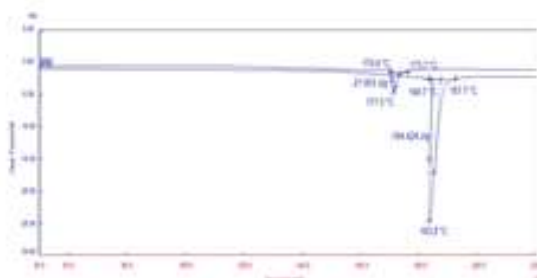


Fig. 3. DSC analysis results of Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)enzyme

DSC analyses were performed to understand the thermal behavior of the Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)enzyme, and the results are illustrated in Fig. 3. As it is reflected from the Fig. 3, the temperature of the end points of the endotherm peaks shifted to lower temperatures with the grafting of the Sol-gel(-)enzyme. T_p value of the Sol-gel(-)enzyme was lower than that of Sol-gel(+)enzyme, as shown in figure 3. This is attributed to the fact that grafted chains might act as internal plasticizers. In our previous study, T_p value of the Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)enzyme were found to be 171 and 184°C. In the present study, an increase in T_p value was seen when sol-gel was crosslinked with enzymes. This increase can be explained by the fact that polymer matrix is more rigid after crosslinked. Similar observations can also be found in the literature (Isiklan et al., 2008; Zohurisaan and Pourjavadi, 2003).

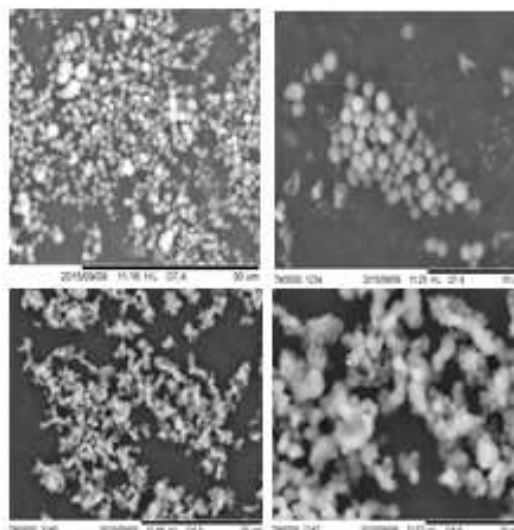


Fig. 4. SEM photographs of cross section of the Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)enzyme

SEM photographs of cross section of the Sol-gel(-)enzyme and Sol-gel(+)enzyme taken at 50 times and 1,000 times magnifications were shown in Fig. 4. By comparing the surface morphology of internal structure of Sol-gel(-)

enzyme (Fig. 4a c) with that of Sol-gel(+)-enzyme (Fig. 4b, d). It was found that the grafted chains drastically changed the morphology of sol-gel formation. As it is seen from the Fig 4b, d, Sol-gel(+)-enzyme (Fig. 4b, d) are almost spherical in shape and show roughness in surface.

To investigate reusability, immobilized enzymes (sol-gel(+)-enzyme) beads were reused in hydrolysis system. Hydrolysis duration was limited to 6 h. The beads were washed with sterile buffer and were added to a new hydrolysis substrate. Peptides concentration was measured in the medium after each hydrolysis process. The results of reusability are summarized in Fig. 5. In the first four hydrolysis processes, the decrease in the production of peptide is not very significant though, in the fourth process, the degree of hydrolysis decreased to about 39%. Similar results were found in all hydrolysis processes with different sol-gel(+)-enzyme of beads. All immobilized enzymes may be reused four times without losing their activity. Similar results have been reported in literature for the reusability (Zhao and Xia, 2010; Behera et al., 2010). However, the reason of decreasing of peptides productivity in fourth batch is due to loss of viability of some immobilized.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Research, Technology and Higher Education, Indonesia.

References

- Behera, S., Kar, S., Mohanty, R.C., Ray, R.C., 2010. Comparative of Bio-ethanol Production from *Madusa latifolia* (L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized agar agar and Ca-alginate matrices. *Appl Energy* 87:96–100.
- Bisht, K. S., Henderson, L. A., Gross, R. A., Kaplan, D. L., Swift, G., 1997. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of β -pentadecalactone. *Macromolecules* 30, 2705–2710.
- Can H.K., 2005. Synthesis of geranyl containing poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) hydrogels in aqueous solutions by γ -irradiated radiation. *Radiat Phys Chem* 72:703–710.
- Chauhan, G.S., Singh, B., Kumar, S., 2005. Synthesis and characterization of *N*-vinyl pyrrolidone and cellulose based functional graft copolymers for use as metal ions and iodine sorbents. *J Appl Polym Sci* 98:373–382.
- Ferreira, L., Ramos, M. A., Dordick, J. S., Gil, M. H., 2003. Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (*Subtilisin* Carlsberg). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21, 189–199.
- Iraklian, N., Lual, M., Kigongo, M., 2008. Synthesis and characterization of poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) grafted sodium alginate hydrogel beads for the controlled release of indomethacin. *J Appl Polym Sci* 110:481–493.
- James, J., Simpson, B. K., 1996. Application of enzymes in food processing. *Crit. Rev. Food Sci Nutr* 36, 437–463.
- Ota, S., Miyazaki, S., Matsumoto, H., Morimoto, K., Shirasaki, Y., Nakanishi, K., 2007. High-throughput protein digestion by trypsin-immobilized mesoporous silica with pipette-tip formula. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70:57–62.
- Peter, F., Poppe, L., Kiss, C., SaDca-Rico, E., Prada, G., Zambra, C., Ohtsuka, A., 2005. Influence of precursors and additives on microbial lipases stabilized by sol-gel entrapment. *Biocatal. Biotransform* 23, 251–260.
- Sevin, M. T., Teilmann, P., Wiesenhöfer, W., Koenig, W., Zonta, A., 2003. Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts. *Adv. Synth. Catal* 345:717–728.
- Saegemö, K., Morris, V. B., Abraham, T. E., 2008. Stability and catalytic properties of encapsulated *subtilisin* in xerogels of siloxanols. *Applied Catalysis A: General* 341:168–173.
- Xie, S., Svec, F., Fréchet, J. M. J., 1999. Design of reactive porous polymer supports for high throughput bioreactors: poly(2-vinyl-4,4-dimethylazlactone-co-acrylamide-co-styrene dimethacrylate) monoliths. *Biotecol. Bioeng.* 62, 30–35.
- Yoshimaru, T., Matsumoto, K., Kuramoto, Y., Yamada, K., Sugano, M., 1997. Preparation of Microencapsulated Enzymes for Lowering the Allergenic Activity of Foods. *J. Agric. Food Chem* 45, 4178–4182.
- Zohuriaan-Mehr, M.J., Pourjavadi, A., 2003. New polysaccharide-polyacrylonitrile copolymers: synthesis and thermal characterization. *Polym Adv Technol* 14:508–516.
- Zhao, J., Xia, L., 2010. Ethanol production from corn *stover* hemicellulose using immobilized recombinant yeast cells. *Biochem Eng J* 49:28–32.