



**ISOLASI PROTEIN *DOUBLE FUNCTION* (ANTIOKSIDAN DAN ANTI-DIABETES TIPE-2) DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*)  
BERDASARKAN TINGKAT MATURASI BIJI  
SECARA IN-VITRO**

**TESIS**

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Magister Bioteknologi (S2)  
dan mencapai gelar Magister Bioteknologi

Oleh

**Anang Supriyadi**  
**NIM 152520101002**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI  
PASCASARJANA  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**



**ISOLASI PROTEIN *DOUBLE FUNCTION* (ANTIOKSIDAN DAN ANTI-DIABETES TIPE-2) DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*)  
BERDASARKAN TINGKAT MATURASI BIJI  
SECARA IN-VITRO**

**TESIS**

Oleh:  
Anang supriyadi  
NIM 152520101002

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.SI, M.SI

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI  
PASCASARJANA  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020**

## PERSEMBAHAN

Tesis ini saya persembahkan kepada:

1. Kedua orang tua, istri dan keluarga yang telah memberikan doa, motivasi, nasihat, dan kasih sayang.
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D. Selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, serta masukan dalam penyelesaian tesis ini,
3. Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si., M.Si. Selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, serta masukan dalam penyelesaian tesis ini, Selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, serta masukan dalam penyelesaian tesis ini,
4. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes Selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan kontribusi, saran, serta masukan dalam penyelesaian tesis.
5. Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.P., ph.D Selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, serta masukan dalam penyelesaian tesis ini, Selaku Dosen Pembimbing Utama, yang telah memberikan kesempatan, bimbingan, serta masukan dalam penyelesaian tesis ini,
6. Rekan-rekan Magister Bioteknologi, khususnya untuk angkatan pertama yang memberi masukan, motivasi, *sharing* informasi dan suka-duka perkuliahan, penelitian, dan penyusunan tesis;
7. Almamater tercinta Program Studi Bioteknologi, Program Pascasarjana, Universitas Jember.

### MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. Ia mendapat pahala (dari kebajikan) yang diusahakannya dan ia mendapat siksa (dari kejahatan) yang dikerjakannya.” (Q.S Al-baqoroh: 286)\*.

Setiap keadaan apapun itu jika diterima dan dijalani dengan rela dan ikhlas, sekalipun berupa ujian atau musibah maka akan terasa indah hingga akan memberikan hawa ketenangan.

---

\*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2000. *Al qur'an an Terjemahannya*. Bandung: Penerbit Jabal.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Anang supriyadi

NIM : 152520101002

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“ISOLASI PROTEIN *DOUBLE FUNCTION* (ANTIOKSIDAN DAN ANTI-DIABETES TIPE-2) DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*) BERDASARKAN TINGKAT MATURASI BIJI SECARA IN-VITRO“** adalah benar-benar karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

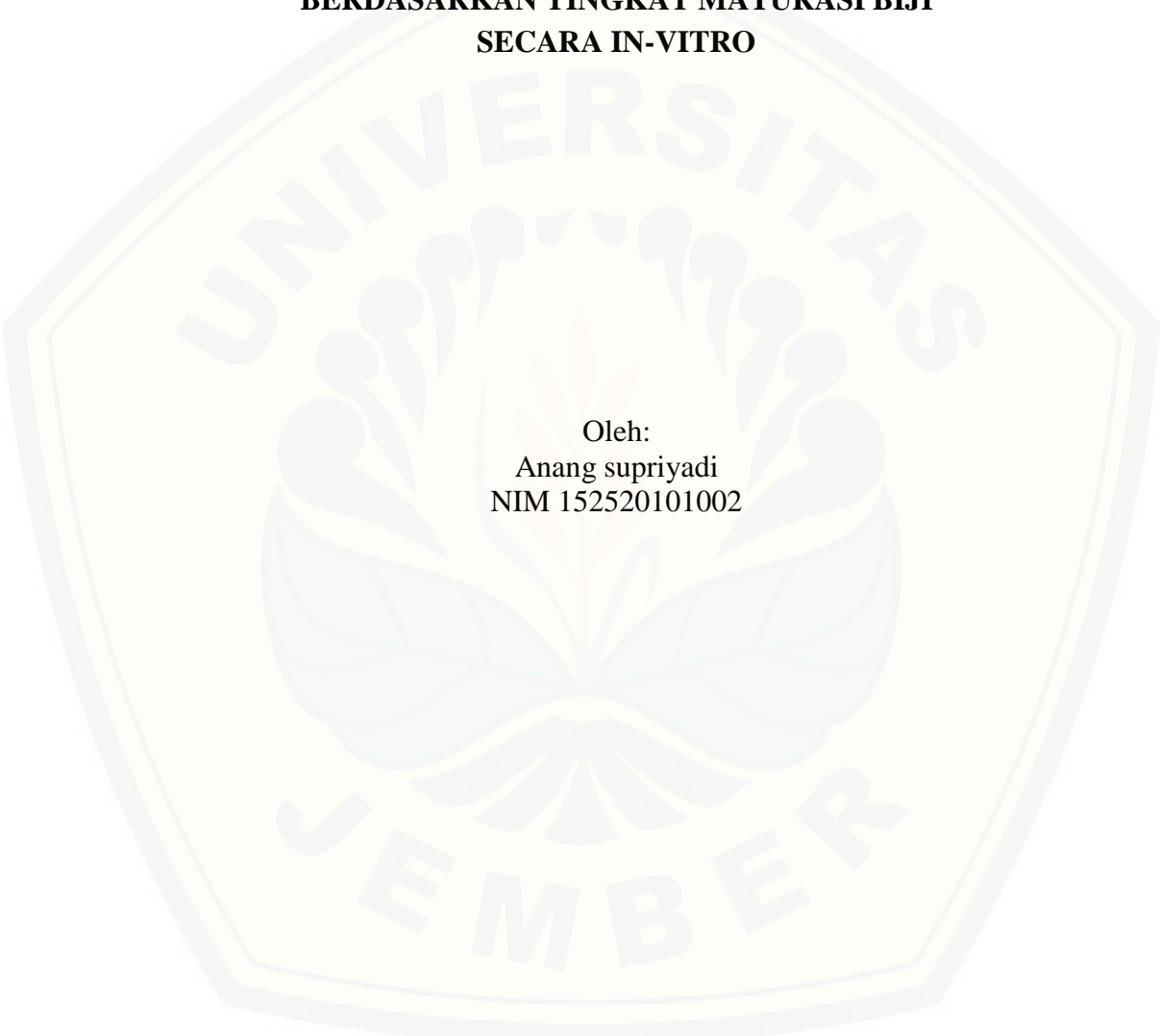
Jember, 11 Desember 2019

Yang menyatakan,

Anang supriyadi  
NIM 152520101002

**TESIS**

**ISOLASI PROTEIN *DOUBLE FUNCTION* (ANTIOKSIDAN DAN ANTI-DIABETES TIPE-2) DARI BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon*)  
BERDASARKAN TINGKAT MATURASI BIJI  
SECARA IN-VITRO**



Oleh:  
Anang supriyadi  
NIM 152520101002

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.SI, M.SI

**PERSETUJUAN PEMBIMBING**

Tesis berjudul “Isolasi Protein *Double Function* (Antioksidan dan Antidiabetes Tipe-2) dari Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) Berdasarkan Tingkat Maturasi Biji secara In-Vitro” telah diuji pada:

Hari, tanggal : Rabu, 11 Desember 2019

Tempat : Pascasarjana Universitas Jember

Dosen pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.Si, M.Si

NIP 197008101998031001

NIP 196805161992031004



**PENGESAHAN**

Tesis berjudul “*Isolasi Protein Double Function (Antioksidan dan Antidiabetes Tipe-2) dari Biji Melinjo (Gnetum gnemon) Berdasarkan Tingkat Pematangan Biji secara In-Vitro*” telah memenuhi persyaratan Keputusan Rektor Universitas Jember, nomor 16887/UN25/SP/2017, tanggal 1 November 2017, tentang Deteksi Dini Tindakan Plagiasi dan Pencegahan Plagiarisme Karya Ilmiah Dosen, Tenaga Kependidikan, dan Mahasiswa Universitas Jember dengan *submission ID 1208811751* serta telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : Rabu, 11 Desember 2019

Tempat : Pascasarjana Universitas Jember

Tim Penguji,  
Ketua,

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

NIP.197008101998031001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M.Kes

Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.P., Ph.D

NIP.197005091999032001

NIDN.000911791

Mengesahkan

Direktur Pascasarjana,

Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S

NIP. 195207061976031006



## RINGKASAN

**Isolasi Protein *Double Function* (Antioksidan dan Antidiabetes Tipe-2) Dari Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) Berdasarkan Tingkat Maturasi Biji Secara In-Vitro;** Anang Supriyadi, 152520101002; 2020; hal 43; Program Studi Magister Bioteknologi Pascasarjana Universitas Jember

Diabetes merupakan penyakit yang disebabkan oleh penumpukan kadar gula dalam darah. Penumpukan kadar gula dalam darah dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas di dalam sel sehingga dapat merusak jaringan. Salah satu pencegahan yang dapat dilakukan untuk mengurangi kadar gula pada penderita diabetes dengan cara menghambat aktivitas enzim kunci  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase. Pada penelitian ini penghambatan aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase dilakukan dengan menggunakan protein dari biji melinjo. Melinjo merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia khususnya di pekarangan-pekarangan rumah. Biji melinjo dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan emping dan sebagai sayuran. Baru-baru ini biji melinjo diketahui mempunyai kandungan protein yang cukup tinggi yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Kandungan protein yang cukup tinggi pada biji melinjo dapat dimanfaatkan sebagai sumber protein *fungsional* khususnya dibidang *nutraceutical*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan sumber protein yang mempunyai kemampuan aktivitas *double function* (antioksidan dan antidiabetes) dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*) dari tingkat maturasi biji. Sehingga mampu mencegah dan mengobati penderita penyakit diabetes.

Ekstraksi sample biji melinjo (hijau, kuning dan merah) dilakukan penumbukan 1 gram biji dengan menambahkan buffer phospat pH 7.0 sebanyak 3 ml, kemudian kandungan protein diukur dengan metode Bradford (Deutcher, 1990). Analisis pola protein menggunakan 15% SDS-PAGE menggunakan metode Laemmli (1970). Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid (ABTS) dilakukan dengan membuat stock ABTS dan Phosphate Buffer Saline (PBS) (Re *et al.*, 1999).

Radikal anion superoksida dianalisis dengan metode Tang *et al.* (2010), sampel protein sebanyak 200  $\mu$ l kemudian ditambahkan dengan 1.7 ml buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.2) dalam tabung reaksi yang berbeda. Pirogalol 10 mM (dalam HCl 10 mM) ditambahkan sebanyak 100  $\mu$ l dan diinkubasi selama 10 menit. Slope reaksi ditentukan dari autooksidasi pirogolol selama 4 menit dengan panjang gelombang 320 nm menggunakan spektrofotometer.

Peredaman radikal hidroksil menggunakan metode Halliwell *et al.* (1987). Analisis penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase protein biji melinjo menggunakan metode Hashim *et al.* (2013) dan Ngawe *et al.* (2011). Fraksinasi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Protein antioksidan dimurnikan menggunakan FPLC (*fast protein liquid chromatography*). Kemudian untuk meningkatkan aktivitas antioksidan dan antidiabetes protein biji melinjo di hidrolisis menggunakan enzim alkalase.

Hasil analisis kandungan N-total pada biji, GM mempunyai kandungan N-total 2.54%, YM 2.42 dan RM 2.19, dimana dalam hal ini GM mempunyai kandungan N-total yang lebih tinggi dibandingkan dengan YM dan RM. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS protein biji melinjo dapat menghambat radikal ABTS dengan konsentrasi protein yang sangat rendah dengan nilai  $IC_{50}$  pada GM 0.33, YM 0.45 dan RM 0.47  $\mu$ g/mL. Protein GM mempunyai nilai penghambatan radikal superoksida yang paling efektif dibandingkan dengan YM dan RM hal ini ditunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  yang lebih kecil dibanding dengan YM dan RM. Protein GM mempunyai nilai 2.36  $\mu$ g/ml YM 3.55  $\mu$ g/ml dan RM 5.20  $\mu$ g/ml. GM lebih efektif dalam menangkal radikal hidroksil dibandingkan dengan YM dan RM karena mempunyai nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah. Pengujian aktivitas penghambatan  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase GM mempunyai aktivitas yang paling efektif dalam menghambat enzim tersebut. Protein GM kemudian di fraksinasi menggunakan FPLC dan didapatkan tujuh fraksi protein yang mempunyai aktivitas antioksidan dan antidiabetes yang berbeda-beda, dimana fraksi protein yang mempunyai aktivitas paling tinggi yaitu pada fraksi 5. Untuk hasil protein melinjo yang di hidrolisis menggunakan enzim

alkalase aktivitas protein melinjo mengalami peningkatan aktivitas antioksidan dan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase.



## SUMMARY

Isolation of Double Function Proteins (Antioxidants and Antidiabetic Type-2) From Melinjo Seeds (*Gnetum gnemon*) Based on In-Vitro Seed Maturation Stage; Anang Supriyadi, 152520101002; 2019; pages; Graduate School of Magister Biotechnology, University of Jember.

Diabetes is a disease caused by a buildup of blood sugar levels. The buildup of blood sugar levels can cause an increase in free radicals in cells so that it can damage tissue. One of the prevention that can be done to reduce sugar levels in diabetics is by inhibiting the activity of the key enzymes  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. In this study, the inhibition of the activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes was carried out using proteins from melinjo seeds. Melinjo is a plant that is found in Indonesia, especially in the yards of houses. Melinjo seeds are used as raw material for making chips and as vegetables. Recently melinjo seeds are known to have a high enough protein content that can be used as an antioxidant. The high protein content in melinjo seeds can be used as a source of functional protein, especially in the field of nutrition. This study aims to obtain a source of protein that has the ability to double function activities (antioxidants and antidiabetic) from melinjo seeds from the maturation level of seeds. So that it can prevent and treat diabetics.

Melinjo seed extraction samples (green, yellow and red) were crushed 1 gram of seeds by adding 3 ml pH phosphate buffer, then the protein content was measured by Bradford method (Deutcher, 1990). Analysis of protein patterns using 15% SDS-PAGE using the method of Laemmli (1970). Testing of antioxidant activity using 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid (ABTS) was carried out by making ABTS stock and Phosphate Buffer Saline (PBS) (Re *et al.*, 1999). Superoxide anion radicals were analyzed by the method of Tang *et al.* (2010), a protein sample of 200  $\mu$ l was then added with 1.7 ml of a 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2) in different test tubes. Pyrogallol 10 mM (in 10 mM HCl) was added as much as 100  $\mu$ l and incubated for 10 minutes. The

reaction slope was determined from pyrogallol autoxidation for 4 minutes with a wavelength of 320 nm using a spectrophotometer. Hydroxyl radical reduction using the method of Halliwell *et al.* (1987). Analysis of melinjo seed protein  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase using the method of Hashim *et al.* (2013) and Ngawe *et al.* (2011). Melinjo Seed (*Gnetum gnemon* L.) Protein Fractionation Antioxidant protein is purified using FPLC (fast protein liquid chromatography). Then to increase the antioxidant and antidiabetic activity of melinjo seed protein in hydrolysis using the enzyme alkalase.

The results of the analysis for the total N-content in seeds, GM has a total N-content of 2.54%, YM 2.42 and RM 2.19, in which case GM has a higher N-total content compared to YM and RM. The results of testing antioxidant activity using ABTS method of melinjo seed protein can inhibit ABTS radicals with very low protein concentrations with  $IC_{50}$  values at GM 0.33, YM 0.45 and RM 0.47  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . GM protein has the most effective superoxide radical inhibition value compared to YM and RM. This is indicated by the smaller  $EC_{50}$  value compared to YM and RM. GM protein has a value of 2.36  $\mu\text{g} / \text{ml}$  YM 3.55  $\mu\text{g} / \text{ml}$  and RM 5.20  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . GM is more effective in counteracting hydroxyl radicals compared to YM and RM because it has a lower  $IC_{50}$  value. Testing the inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase GM has the most effective activity in inhibiting the enzyme. The GM protein was then fractionated using FPLC and seven protein fractions were obtained which had different antioxidant and antidiabetic activities, where the protein fraction that had the highest activity was in fraction 5. For the results of the melinjo protein hydrolyzed using the alkalase enzyme, the activity of melinjo protein experienced increased antioxidant activity and inhibitory activity of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase enzymes.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, taufiq dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Isolasi Protein *Double Function* (Antioksidan dan Antidiabetes Tipe-2) dari Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) Berdasarkan Tingkat Pematangan Biji secara In-Vitro”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada Program Studi Bioteknologi, Program Pascasarjana, Universitas Jember.

Sejak perencanaan penelitian sampai penyusunan, tesis ini tidak terlepas dari kendala-kendala yang ada. Namun, berkat dukungan dan arahan dari berbagai pihak sehingga penyusunan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S selaku Direktur Pascasarjana Universitas Jember
2. Prof. Ir. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Agr., Ph.D. selaku Kaprodi Bioteknologi, Program Pascasarjana, Universitas Jember.
3. Prof. Ir. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Anak Agung Istri Ratnadewi, S.SI, M.SI, selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian guna memberikan bimbingan dan pengarahan demi terselesaikannya penyusunan tesis ini;
4. Dr. Drg. Banun Kusumawardani M.Kes dan Dr. Agung puspito selaku Dosen Penguji yang telah mengevaluasi dan memberi saran demi perbaikan penulisan tesis ini;
5. Segenap dosen, karyawan dan teknisi Laboratorium CDAST (*Center Development of Advanced Science and Technology*) Universitas Jember atas kerjasama yang diberikan;
6. Keluargaku yang telah memberikan dorongan doa, motivasi, nasihat, dan kasih sayang yang tiada henti;

7. Sahabat dan rekan seperjuangan, senasib, dan sepenanggungan (Magister Bioteknologi Angkatan 1) yang selalu memberikan saran, motivasi, semangat, dan bantuan;
8. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu;

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan tesis ini sangat penulis harapkan. Akhirnya penulis berharap agar tesis ini dapat bermanfaat dan menambah wawasan serta pengetahuan bagi pembaca.

Jember, 11 Desember 2019

Penulis



**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>PRAKATA</b> .....	xiii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xviii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xx
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Perumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	2
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	2
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
<b>2.1 Tanaman Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>)</b> .....	3
<b>2.2 Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>)</b> .....	3
<b>2.3 Protein Hidrolisis</b> .....	4
<b>2.4 Antioksidan</b> .....	5
<b>2.5 Radikal Bebas</b> .....	6
<b>2.6 Diabetes Mellitus (DM)</b> .....	6
<b>2.7 <math>\alpha</math>-amilase</b> .....	8
<b>2.8 <math>\alpha</math>-glukosidase</b> .....	8
<b>2.9 Hubungan Diabetes dengan Radikal Bebas</b> .....	9

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....</b>	<b>10</b>
<b>3.3 Alat dan Bahan Penelitian .....</b>	<b>10</b>
3.3.1 Alat Penelitian.....	10
3.3.2 Bahan Penelitian .....	10
3.3.3 Rancangan Penelitian.....	10
<b>3.4 Pelaksanaan Penelitian.....</b>	<b>10</b>
3.4.1 Ekstraksi sampel .....	10
3.4.2 Penentuan Total Protein Terlarut dan Kandungan Asam Amino	11
3.4.3 Elektroforesis SDS-PAGE .....	11
3.4.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan metode ABTS .....	11
3.4.5 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida .....	12
3.4.6 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil .....	12
3.4.7 Uji Penghambatan $\alpha$ -amilase .....	13
3.4.8 Uji Penghambatan $\alpha$ -glukosidase .....	13
3.4.9 Hidrolisis Enzimatik Protein Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ) ..	14
3.4.10 Fraksinasi Protein Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ).....	14
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Maturasi Biji Melinjo.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Kandungan asam amino pada biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>) .</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Kandungan total nitrogen dan total asam amino pada biji melinjo</b>	
<b>(<i>Gnetum gnemon</i>) .....</b>	<b>17</b>
<b>4.4 Aktivitas antioksidan protein biji melinjo secara in vitro .....</b>	<b>18</b>
4.4.1 Aktivitas Penghambatan Radikal ABTS.....	18
4.4.2 Aktivitas Penghambatan Radikal Superoksida .....	19
4.4.3 Aktivitas Penghambatan Radikal Hidroksil.....	20
<b>4.5 Aktivitas Antidiabetes Protein Biji Melinjo.....</b>	<b>21</b>
4.5.1 Aktivitas Penghambatan $\alpha$ -amilase.....	21
4.5.2 Aktivitas Penghambatan $\alpha$ -glukosidase .....	22
<b>4.6 Pola Protein Biji Melinjo Menggunakan Elektroforesis</b>	
<b>SDS-PAGE .....</b>	<b>24</b>

<b>4.7 Protein Hidrolisis menggunakan Alkalase .....</b>	<b>25</b>
<b>4.8 Kemampuan Aktivitas Antioksidan Protein Hidrolisis Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>) .....</b>	<b>26</b>
<b>4.9 Kemampuan Aktivitas Penghambatan <math>\alpha</math>-amilase dan <math>\alpha</math>-glukosidase .....</b>	<b>27</b>
<b>4.10 Analisis Protein biji Melinjo Hijau menggunakan FPLC .....</b>	<b>28</b>
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>31</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>31</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>31</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>37</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.2 Total kandungan nitrogen, total asam amino (TAA), total antioksidan asam amino (TAntAA) dan rasio total antioksidan asam amino per total asam amino (TAntAA/TAA).....	16
4.3 Total kandungan nitrogen, total asam amino (TAA), total antioksidan asam amino (TAnAA) dan rasio total antioksidan asam amino per total asam amino (TantAA/TAA) .....	17
4.4.1 Nilai EC <sub>50</sub> aktivitas penghambatan radikal bebas protein biji melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ) pada tingkat maturasi .....	19
4.5.1 Nilai IC <sub>50</sub> penghambatan aktivitas $\alpha$ -amilase dan $\alpha$ -glukosidase protein biji melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ) pada tingkat maturasi .....	22
4.8 Nilai EC <sub>50</sub> aktivitas penghambatan radikal bebas sebelum dan sesudah hidrolisis .....	26
4.9 IC <sub>50</sub> penghambatan aktivitas $\alpha$ -amilase dan $\alpha$ -glukosidase protein biji melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ) sebelum dan sesudah hidrolisis .....	28
4.10 Nilai EC <sub>50</sub> untuk aktivitas radikal bebas dan nilai IC <sub>50</sub> untuk penghambatan aktivitas $\alpha$ -amilase dan $\alpha$ -glukosidase oleh fraksi protein benih GM ( <i>Gnetum gnemon</i> ) .....	29

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
4.1 Biji melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> ) berdasarkan tingkat maturasi.....	15
4.6 Hasil analisa pola protein biji melinjo berdasarkan tingkat maturasi biji menggunakan elektroforesis SDS-PAGE.....	24
4.7 Hasil analisa pola protein biji mlinjo sebelum dan sesudah hidrolisis berdasarkan tingkat maturasi biji menggunakan elektroforesis SDS-PAGE.....	25
4.10 Eluasi fraksi protein GM pada kolom Superdex <sup>Tm200</sup> 10/30 GL (10 x 30 mm) menggunakan Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ..	29

**DAFTAR LAMPIRAN**

- A. Kandungan asam amino (g/100 g protein) protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*) berdasarkan tingkat maturasi
- B.1 Persentase Hasil Analisis ABTS pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Maturasi
- B.2 Persentase Hasil Analisis Superoksida pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Maturasi
- B.3 Persentase Hasil Analisis Hidroksil pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Maturasi
- B.4 Persentase Hasil Analisis Penghambatan  $\alpha$  amilase pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Maturasi.
- C. Persentase Hasil Analisis Penghambatan  $\alpha$  glukosidase pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Maturasi.
- D. Publikasi Jurnal International Current Research In Nutrition and Food Science



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Diabetes merupakan penyakit yang disebabkan oleh penumpukan kadar gula dalam darah. Penumpukan kadar gula dalam darah dapat menyebabkan peningkatan radikal bebas di dalam sel sehingga dapat merusak jaringan. Data terbaru dari International Diabetes Federation (IDF) (2015), menyebutkan bahwa penderita diabetes melitus seluruh dunia mencapai 4.72 milyar dan memperkirakan pada tahun 2040, penderita diabetes akan meningkat menjadi 6.16 milyar jiwa, dari jumlah tersebut diabetes mellitus tipe-2 mencapai 87-91%. Peningkatan jumlah penderita diabetes melitus tipe-2 sudah menjadi perhatian serius sedangkan obat sintetis yang telah banyak digunakan, dilaporkan menyebabkan berbagai efek samping seperti rasa mual, kembung, dan diare.

Beberapa tahun terakhir obat sintesis untuk diabetes tipe-2 telah diketahui mempunyai efek samping sehingga perlu adanya penggunaan obat melalui sumber-sumber dari alam yang dapat menangkal radikal bebas dan menghambat enzim kunci yang berperan dalam pencernaan pati  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Maritim, 2003). Enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase merupakan dua enzim yang terlibat dalam pemecahan pati menjadi glukosa, sehingga meningkatkan jumlah glukosa dalam aliran darah. Enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase dapat dilakukan upaya penghambatan sehingga kadar glukosa dalam darah tidak mengalami penumpukan. Penumpukan kadar gula darah nantinya dapat mengakibatkan terjadinya peningkatan radikal bebas dan rusaknya sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh (Erdos dan Skidgel, 1987). Sehingga perlu adanya pencegahan dengan cara menghambat kedua enzim tersebut dan menangkal radikal bebas yang terbentuk akibat penumpukan kadar gula di dalam darah, salah satunya menggunakan bahan nutrasiutikal alami. Salah satu bahan yang mempunyai potensi yaitu biji melinjo.

Biji melinjo telah diketahui mempunyai kandungan protein yang mempunyai aktivitas antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas (Siswoyo *et al.*, 2011). Kandungan protein dari biji melinjo yang relatif besar berpotensi



sebagai sumber protein fungsional alami (Siswoyo *et al*, 2007). Oleh sebab itu dalam penelitian ini dilakukan pengkajian protein yang berasal dari biji melinjo pada tingkat kematangan yang berbeda sehingga nantinya didapatkan protein yang mempunyai kandungan antioksidan tinggi dan mampu menghambat enzim  $\alpha$ -amilase dan enzim  $\alpha$ -glukosidase.

### **1.2 Perumusan Masalah**

Biji melinjo diketahui mempunyai aktivitas antioksidan yang cukup tinggi. Akan tetapi masih belum diketahui protein yang mempunyai *double functions* (antioksidan dan antidiabetes). Oleh sebab itu perlu dilakukan karakterisasi protein dari tingkat maturasi biji sehingga didapatkan sumber protein untuk bahan nutrasiutikal.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Mendapatkan sumber protein yang mempunyai kemampuan aktivitas *double function* (antioksidan dan antidiabetes) dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*) dari tingkat maturasi biji.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Protein yang diperoleh dapat digunakan sebagai bahan nutrasiutikal alami dan sumber peptida antioksidan dan antidiabetes.

## BAB 2. TINJUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon*)

Melinjo merupakan tanaman yang berasal dari Asia Tenggara seperti Myanmar, Malaysia, Filipina, Indonesia dan Papua Nugini. Berikut ini klasifikasi tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menurut *National Tropical Botanical Garden* (2015),

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivisi : Spermathophyta

Divisi : Gnetophyta

Kelas : Gnetopsida

Ordo : Gnetales

Famili : Gnetaceae

Genus : *Gnetum* L.

Spesies : *Gnetum gnemon* L.

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki berbagai macam manfaat. Menurut Yang *et al.*, (2007) biji merupakan tempat akumulasi protein terbesar. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terdiri dari 58% pati, 16.4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo *et al.*, 2007). Protein dalam biji melinjo yang cukup tinggi berpotensi sebagai sumber antioksidan yang dapat meredam radikal bebas dan dapat mencegah terbentuknya stres oksidatif yang dapat merusak DNA, lipid dan jaringan (Siswoyo, 2014).

### 2.2 Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*)

Protein merupakan polipeptida berbobot molekul tinggi yang tersusun atas beberapa asam amino yang bergabung membentuk ikatan peptida (-CONH-). Peptida merupakan monomer dari protein yang terdiri (kurang atau sama dengan 100) asam amino (Hu, 2014). Semua asam amino (kecuali prolin) mempunyai struktur dasar yang sama, yaitu terdiri dari gugus karboksilat (-COOH), gugus amino (-NH<sub>2</sub>), dan gugus R sebagai gugus fungsional (*side chain*) yang

menentukan sifat kimiawi protein (Fatchiyah *et al.*, 2011). Selain ikatan peptida, protein juga mempunyai ikatan nonkovalen. Struktur tersier protein terbentuk melalui interaksi antara gugus R pada rantai polipeptida.

Kandungan protein pada biji yang relatif sangat besar merupakan suatu potensi sebagai sumber protein fungsional alami. Dari hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa protein dari biji melinjo mempunyai potensi sebagai antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas (Siswoyo *et al.*, 2011). Protein yang mempunyai aktivitas antioksidan mempunyai berat molekul 30 dan 12 kDa (Siswoyo dan Aldino, 2007).

Biji melinjo diketahui mengandung berbagai macam senyawa yang bermanfaat baik makromolekul berupa protein maupun mikromolekul berupa senyawa fenolik dan flavonoid. Menurut Siswoyo *et al.*, (2011), pada biji melinjo ditemukan 2 fraksi protein yang memiliki aktivitas antioksidan yang efektif menangkal radikal bebas. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan pengujian terhadap protein biji melinjo dari tingkat maturasi, sehingga nantinya didapatkan sumber protein yang paling potensi sebagai antioksidan dan antidiabetes.

### 2.3 Protein Hidrolisis

Protein dengan berat molekul rendah dapat diperoleh dengan cara menghidrolisis protein secara kimia (hidrolisis asam dan basa) dan enzimatik. Hidrolisis secara kimia sulit dikontrol sehingga dapat mendegradasi asam amino, dan menghasilkan produk toksis seperti *lysino-alanine*. Hidrolisis enzimatik bekerja tanpa merusak asam amino, tidak menggunakan suhu dan pH yang ekstrim seperti hidrolisis kimia (You *et al.*, 2009). Hidrolisis protein biasanya menggunakan enzim proteolitik seperti alkalase, flavorzyme, protamex, dan neutrase yang memiliki perbedaan karakteristik pada produk hasil hidrolisisnya (Damrongsakkul *et al.*, 2008; Muhamyankaka *et al.*, 2013). Dalam penelitian protein biji melinjo di hidrolisis menggunakan enzim alkalase.

Alkalase diproduksi dari *Bacillus licheniformis*, termasuk famili subtilisins dalam kelompok serine protease dan merupakan enzim komersial yang digunakan untuk memproduksi protein hidrolisat (Sujith dan Hymavathi, 2011). Enzim ini

bekerja optimal pada suhu 50°C, pH 8, buffer 0.1 M KPI, selama 7-8 jam dan E/S 0.2 % (Siswoyo and Hosogawa, 2014), serta toleransi pH yang luas antara pH 5-11 (Peksa dan Miedzianka, 2014). Alkalase termasuk golongan endoprotease (Peksa and Miedzianka, 2014) yang menghidrolisis ikatan peptida pada pertengahan rantai polipeptida bukan dari sisi C terminal atau N terminal (Sujith and Hymavathi, 2011). Alkalase menghidrolisis ikatan peptida pada spesifisitas luas yaitu ikatan peptida yang memiliki gugus fungsional (*side chain*) berupa asam amino hidrofobik (Sujith and Hymavathi, 2011) seperti asam amino dengan gugus aromatik: Tyr, Trp, dan Phe (Peksa and Miedzianka, 2014).

#### 2.4 Antioksidan

Antioksidan dapat ditemukan di dalam bahan-bahan yang berasal dari alam. Antioksidan sendiri dapat melawan pengaruh radikal bebas (Tursiman *et al.*, 2012). Radikal bebas adalah molekul yang tidak mempunyai pasangan di luar orbitnya. Radikal bebas dihasilkan dari reaksi kimia dan proses metabolik. Stres oksidatif didalam tubuh dapat menimbulkan terjadinya radikal bebas sehingga mempengaruhi kinerja insulin. Insulin berfungsi untuk menurunkan kadar gula dalam darah. Terbentuknya radikal dalam jumlah banyak dapat meningkatkan stres oksidatif yang dapat merusak lipid dan protein. Kerusakan tersebut dapat mengakibatkan komplikasi penyakit seperti ginjal dan aterosklerosis Maritim *et al.*, 2003). Secara pengertian kimis antioksidan merupakan senyawa penyumbang elektron positif. Sistem kerja dari antioksidan dengan cara menyumbangkan elektron terhadap senyawa yang bersifat oksidan yang menghambat senyawa tersebut (Winarsi, 2007).

Secara alami tubuh mempunyai sistem pertahanan radikal bebas ketika proses metabolisme dalam keadaan normal. Antioksidan merupakan inhibitor yang menghambat proses oksidasi dengan cara menempelkan elektron dengan radikal sehingga radikal bebas menjadi stabil. Antioksidan terbukti mampu mengurangi resiko terhadap beberapa penyakit seperti jantung dan kanker (Rohmatussolihat, 2009). Radikal bebas dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti, asap rokok, radiasi, stres dan polusi (Rohdiana, 2001).

## 2.5 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan elektron yang tidak mempunyai pasangan (Murray *et al.*, 2009) sehingga menyebabkan radikal bebas tidak stabil dan memiliki reaktivitas yang sangat tinggi dalam upaya untuk mendapatkan pasangan dengan mengikat elektron di sekitarnya. Menurut Winarsi (2007), apabila dua senyawa radikal bertemu akan terbentuk senyawa yang stabil. Dalam keadaan normal, tubuh manusia membentuk radikal bebas sebagai produk sampingan metabolisme sel. Selain berasal dari dalam tubuh, radikal bebas juga berasal dari luar tubuh seperti, polusi lingkungan, radiasi, obat-obatan tertentu, dan pestisida (Lobo *et al.*, 2010).

Radikal bebas dalam sistem biologi sering berasal dari molekul oksigen, nitrogen dan sulfur. Kelompok radikal bebas tersebut disebut *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS) dan *reactive sulfur species* (RSS) (Lu *et al.*, 2010). Radikal Hidroksil (OH•), anion superoksida (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidrogen dan peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) merupakan beberapa contoh spesies oksigen reaktif (ROS) (Murray *et al.*, 2009). ROS di bentuk selama metabolisme seluler dan aktivitas fisiologis, dan memiliki peranan penting dalam *cell signalling*, apoptosis, ekspresi gen dan transportasi ion (Lu *et al.*, 2010). Namun jika ROS dalam jumlah yang banyak dapat memiliki efek merusak pada banyak molekul biologis seperti DNA, protein, karbohidrat dan lipid (Lobo *et al.*, 2010). ROS dapat menyerang pangkalan di asam nukleat, amino rantai samping asam protein dan ikatan ganda dalam asam lemak tak jenuh, di mana OH• adalah oksidan terkuat (Lu *et al.*, 2010). Kerusakan ini akan mengubah struktur dan fungsi sel sehingga dapat mengganggu kinerja organ secara umum (Winarsi, 2007).

## 2.6 Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes melitus (DM) masuk dalam kelompok penyakit metabolik yang di akibatkan kelainan dari sekresi insulin dan kerja insulin. DM adalah penyakit metabolik (kebanyakan herediter) sebagai akibat dari kurangnya insulin efektif (DM Tipe 2) atau insulin *absolut* (DM Tipe 1) didalam tubuh (Tjokroprawiro, 2007). Diabetes Mellitus tipe-1 dicirikan dengan hilangnya sel *beta* penghasil



insulin pada *Langerhans* pankreas sehingga terjadi kekurangan insulin pada tubuh. Sampai saat ini, diabetes tipe-1 tidak dapat dicegah. Penyebab terbanyak dari kehilangan sel *beta* pada diabetes tipe-1 adalah kesalahan reaksi *autoimunitas* yang menghancurkan sel *beta* pankreas. Reaksi *autoimunitas* tersebut dapat dipicu oleh adanya infeksi pada tubuh. Saat ini diabetes tipe-1 hanya dapat diobati dengan menggunakan insulin, dengan pengawasan yang teliti terhadap tingkat glukosa darah melalui alat monitor pengujian darah (Maulana, 2008).

Diabetes tipe-1 merupakan kondisi yang ditandai dengan tingginya kadar gula atau glukosa dalam darah. Akibatnya, penderita diabetes tipe 1 memerlukan tambahan insulin dari luar. Normalnya, kadar gula dalam darah dikontrol oleh hormon insulin yang dihasilkan oleh pankreas. Diabetes menjadikan perubahan progresif kepada struktur sel  $\beta$  pankreas (Prameswari dan Widjanarko, 2014). Gejala yang sering terjadi pada penderita penyakit diabetes sering buang air kecil, sehingga penderita merasa perlu minum yang berlebihan dan merasa lapar yang menjadikan penderita diabetes mudah lelah dan berat badan menurun.

Kelainan sistem insulin pada penderita diabetes mengakibatkan kekebalan pada insulin. Saat terjadi kekebalan insulin sel  $\beta$ -pankreas dan mengakibatkan hiperinsulinemia, dimana kadar glukosa di dalam darah masih sedikit mengalami peningkatan. Sel  $\beta$ -pankreas sudah tidak mampu bekerja dengan optimal maka akan terjadi peningkatan diabetes menjadi tipe-2 akibat kadar gula yang meningkat. Faktor terjadinya resistensi insulin dan hiperinsulinemia ini juga dapat disebabkan karena faktor genetik dan inaktivitas (Jafar, 2011).

Resistensi insulin berhubungan dengan obesitas terutama pada bagian perut, tetapi ada sebagian yang terjadi pada orang kurus. Gejala yang timbul pada penderita diabetes tipe-2 sebagai berikut, poliuria, polifagi, polidipsi, hiperglikemia dan berat badan yang menurun (Jafar, 2011). Beberapa faktor penyebab diabetes melitus tipe-2 yaitu stres, pola makan, merokok hipertensi dan obesitas (Indraswari, 2010).

Terapi medik yang sering digunakan dengan cara mengatur pola makan dengan mengurangi karbohidrat dan gula dan memperbanyak kegiatan olah raga fisik, tetapi apabila kurang maksimal maka perlu adanya penggunaan obat oral.

Obat oral hipoglikemik ternyata dapat digunakan pada beberapa pasien diabetes tipe-2 yang tujuannya menstimulasi insulin dari sel  $\beta$ -pankrea atau mengurangi kadar glukosa (Jafar, 2011). Kekurangan dari obat antidiabetik mempunyai efek samping seperti mual dan pusing, sehingga disarankan untuk mengkonsumsi obat tradisional atau obat herbal dalam mengobati dan mencegah penyakit diabetes (Prameswari dan Widjanarko, 2014).

### 2.7 $\alpha$ -amilase

Enzim amilase merupakan enzim yang mampu memutuskan ikatan glikosida yang mampu memaksimalkan kecepatan reaksi kimia yang biasanya berlangsung lambat. Enzim amilase tidak bisa merubah titik kesetimbangan reaksi katalisisnya dan enzim ini juga tidak dapat berkurang atau berubah (Lehninger, 1982).

Enzim  $\alpha$  amilase bereaksi dengan molekul substrat (pati), sehingga enzim tersebut akan merombak pati dan akan menghasilkan senyawa glukosa, dengan cara menghidrolisis ikatan glikosidik  $\beta$ -1.4 menjadi glukosa yang diakibatkan oleh terurainya amilosa (Lynd, 2002). Glukosa yang dihasilkan akibat proses hidrolisis selama reaksi enzimatik dapat diukur dengan menggunakan asam dinitro salisilat (DNS) pada panjang gelombang 550 nm. Nilai absorbansi yang dihasilkan dapat menentukan kadar glukosa yang terbentuk, akibat hidrolisis secara enzimatik.

### 2.8 $\alpha$ -glukosidase

$\alpha$ -glukosidase merupakan enzim yang mempunyai peranan dalam melakukan proses pemecahan karbohidrat menjadi bentuk yang lebih sederhana menjadi glukosa pada saluran pencernaan (Subroto, 2006).  $\alpha$ -glukosidase dapat meningkatkan kadar gula di dalam darah, sehingga dibutuhkan pencegahan agar kadar glukosa dalam darah tidak meningkat dengan cara menghambat  $\alpha$ -glukosidase. Glukosa yang di lepas akan diabsorpsi pada lumen usus dan masuk kedalam sirkulasi darah sehingga dapat menyebabkan hiperglikemia postprandial dan berujung pada DM tipe-2 (Luo *et al.*, 2015). Obat antihiperlilemik



mempunyai efek lebih besar dibandingkan obat yang di ambil dari sumber alami (Niwa et al., 2011).

Penghambatan enzim  $\alpha$ -glukosidase salah satu pendekatan terapeutik untuk mengurangi kadar glukosa darah (Manaharan *et al.*, 2011) karena dengan dihambatnya kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase, maka dapat menunda penguraian oligosakarida dan disakarida menjadi monosakarida (Shinde, 2008) sehingga senyawa yang dapat menghambat kerja enzim  $\alpha$ -glukosidase tersebut dapat digunakan sebagai obat oral untuk pasien DM tipe-2.

## 2.9 Hubungan Diabetes dengan Radikal Bebas

Diabetes melitus tipe-2 berhubungan dengan kadar glukosa darah, kadar glukosa yang tinggi diperkirakan menjadi penyebab kerusakan pada jaringan (Rahbani *et al.*, 1999). Kejadian ini diakibatkan karena kemampuan hiperglikemia secara *in vivo* yang mampu merubah oksidatif berbagai substrat. Hiperglikemia terlibat dalam terbentuknya radikal bebas (Droge W, 2002). Terbentuknya senyawa reaktif mampu memodifikasi lipid, protein dan DNA pada jaringan (Ueno *et al.*, 2002).

Penambahan antioksidan mampu mencegah komplikasi klinis DM tipe-2 (Rahbani *et al.*, 1999). Status oksidatif pada penderita DM tipe-2 dapat dilakukan dengan antioksidan dan memperbaiki sistem seluler yang nantinya akan merangsang respon menantang oksidatif (Nuttal *et al.*, 1999). Sumber stres oksidatif pada penderita DM tipe-2 terjadi akibat autooksidasi glukosa, penurunan konsentrasi antioksidan, dan gangguan aktivitas pertahanan antioksidan enzimatik, hal ini terjadi sejak awal terjadinya penyakit DM tipe-2 (Kowluru *et al.*, 2001). Sehingga stres oksidatif pada penderita DM tipe-2 dapat mengakibatkan penyakit komplikasi.

## BAB 3. METODOLOGI

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian di Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advance Science and Technology*) Universitas Jember. Waktu Penelitian pada bulan Juni 2016 sampai April 2018.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaker incubator* (Stuart SI600), spektrofotometer (Hitachi U-2900 UV-Vis), SDS-PAGE (Bio-Rad), sentrifuge (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII) dan FPLC (*fast protein liquid chromatography*), serta alat pendukung lainnya.

#### 3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji melinjo dengan tingkat kematangan yang berbeda yaitu (Hijau (GM), Kuning (YM) dan Merah (RM)), enzim alkalase 24L FG (2.4 AU/g dan densitasnya 1.18 g/mL), enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase, ABTS, pirogalol,  $H_2O_2$ , Bradford dan bahan untuk elektroforesis SDS-PAGE, serta bahan pendukung lainnya.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok menggunakan 2 faktor dengan 3 kali pengulangan. Faktor pertama yaitu faktor tingkat kematangan dan faktor kedua menggunakan faktor konsentrasi protein dengan tiga kali pengulangan.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sample biji melinjo dilakukan penumbukan 1 gram biji dengan menambahkan buffer phospat pH 7.0 sebanyak 3 ml, ditambahkan pasir quarsa

untuk mempermudah ekstraksi, kemudian disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh tersebut merupakan protein yang dihasilkan dari biji melinjo. Dalam hal ini biji yang di ekstraksi yaitu biji yang berwarna hijau, kuning dan merah.

#### **3.4.2 Penentuan Total Protein Terlarut dan Kandungan Asam Amino**

Kandungan protein diukur dengan metode Bradford (Deutcher, 1990). Sampel 10 µl ditambahkan dengan aquades 40 µl dan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Hasil dibandingkan dengan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) untuk mengetahui kandungan protein terlarut.

#### **3.4.3 Elektrofesis SDS-PAGE**

Analisis pola protein menggunakan 15% SDS-PAGE menggunakan metode Laemmli (1970). *Separating gel* 15% dituang ke dalam *plate* pembentuk gel sampai batas yang terdapat pada *plate*, kemudian *stacking gel* dituang di atas *separating gel*, *comb* dimasukkan untuk membuat sumuran sampel. Sampel protein ditambahkan *SDS-reducing buffer* 1:1 (v/v) kemudian dipanaskan pada suhu 95<sup>o</sup> C selama 3 menit. Kemudian sampel protein dengan konsentrasi yang sama dimasukkan ke dalam sumur gel, kemudian *running* pada 25-80 volt sampai *tracking dye* mencapai jarak 0.5 cm dari dasar gel. Setelah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*. Gel direndam dalam larutan staining, di-shaker pada kecepatan 36 rpm selama 0.5 jam untuk mewarnai pita protein. Kemudian proses pencucian dilakukan 2-3 kali atau sampai pita protein terlihat jelas. Berat molekul protein dapat diperkirakan dengan membandingkan antara pola protein sampel dengan marker protein yang telah diketahui berat molekulnya.

#### **3.4.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan metode ABTS**

Pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan 2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazole-6-sulfonic acid (ABTS) dilakukan dengan membuat stock ABTS dan Phosphate Buffer Saline (PBS) (Re *et al.*, 1999) Pembuatan stok

ABTS yaitu dengan melarutkan 0.38 gram ABTS yang ditambah dengan 0.066 gram potassium persulfat ke dalam 50 mL H<sub>2</sub>O. Sedangkan pembuatan stock 0.2 M PBS yaitu 3.57 gram NaH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> ditambahkan 26.08 gram Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (H<sub>2</sub>O) dan dilarutkan dengan 500 mL aquadest dan ditambahkan dengan 5.4 gram NaCl. Setelah selesai dilakukan pembuatan working stock kemudian mengukur nilai absorbansi ± 0.7-0.75 dengan panjang gelombang 734 nm dan siap untuk digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan dengan peredam ABTS menggunakan rumus:

$$\text{Peredam ABTS (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100\%$$

dimana A<sub>c</sub> sebagai absorbansi kontrol dan A<sub>s</sub> sebagai absorbansi sampel.

#### 3.4.5 Analisis Peredaman Radikal Anion Superoksida

Radikal anion superoksida dianalisis dengan metode Tang *et al.* (2010), sampel protein sebanyak 200 µl kemudian ditambahkan dengan 1.7 ml buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8.2) dalam tabung reaksi yang berbeda. Pirogalol 10 mM (dalam HCl 10 mM) ditambahkan sebanyak 100 µl dan diinkubasi selama 10 menit. Slope reaksi ditentukan dari autooksidasi pirogalol selama 4 menit dengan panjang gelombang 320 nm menggunakan spektrofotometer.

#### 3.4.6 Analisis Peredaman Radikal Hidroksil

Peredaman radikal hidroksil menggunakan metode Halliwell *et al.* (1987), yang terdiri dari 50 µl 2-deoksi-D-ribosa 28 mM (dalam buffer fosfat 20 mM pH 7.4) ditambahkan dengan supernatan 150 µl, 100 µl EDTA 1 mM, 100 µl FeCl<sub>3</sub> 10 mM, 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, dan 50 µl asam askorbat 1 mM diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. 500 µl TBA 1% dan 500 µl TCA 2.8% ditambahkan kemudian larutan divortex dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 80<sup>0</sup>C untuk menghasilkan warna pink. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 532 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

### 3.4.7 Uji Penghambatan $\alpha$ -amilase

Analisis penghambatan  $\alpha$ -amilase protein biji melinjo menggunakan metode Hashim *et al.* (2013) yang dimodifikasi. Sebanyak 100  $\mu$ l protein biji melinjo ditambahkan 150  $\mu$ l  $\alpha$ -amilase (0.1 u/ml) sedangkan untuk kontrol ditambahkan 150  $\mu$ l buffer fosfat pH 6.9. Larutan dipreinkubasi selama 15 menit pada suhu 37<sup>o</sup> C. Setelah itu ditambahkan 250  $\mu$ l pati telurut (1% w/v) larutan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37<sup>o</sup> C. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan mendidihkan selama 1 menit. Kemudian diambil 160  $\mu$ L ditambahkan 80  $\mu$ l reagen DNS untuk menentukan total gula reduksinya. Setelah itu diencerkan dengan 720  $\mu$ l aquades dan diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian dibandingkan dengan akarbosa yang merupakan obat antidiabetes yang sudah dipasarkan digunakan sebagai standarnya. Persen penghambatan  $\alpha$ -amilase oleh masing-masing ekstrak dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Persen penghambatan} = [(A_{C+} - A_{C-}) - (A_{S+} - A_{S-})] / (A_{C+} - A_{C-}) \times 100\%$$

Dimana C+ adalah kontrol sampel dengan enzim dan C- adalah kontrol sampel tanpa enzim. Sedangkan S+ adalah sampel dengan enzim dan S- adalah sampel tanpa enzim.

### 3.4.8 Uji Penghambatan $\alpha$ -Glukosidase

Analisis penghambatan  $\alpha$ -glukosidase mengacu pada Ngawe *et al.* (2011) yang dimodifikasi. Pertama, larutan kontrol dibuat dengan mencampurkan 1 ml sukrosa, 1 mL aquades. Kedua, larutan dasar dibuat dengan bahan dan jumlah yang sama. Ketiga, larutan uji dibuat dengan 1 ml sukrosa dan 1 ml sampel protein dengan *range* konsentrasi total protein tertentu. Diprainkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 5 menit. Reaksi dimulai dengan menambahkan 1 ml  $\alpha$ -glukosidase ke dalam larutan kontrol dan uji, sedangkan larutan dasar ditambah 1 ml aquades. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37<sup>o</sup>C. Reaksi dihentikan dengan pemanasan menggunakan air mendidih selama 10 menit. Kemudian jumlah glukosa yang dihasilkan dideteksi dengan menambahkan 1 ml reagen GOD (*glucose oxidase, peroxidase, 4-aminoantipyrine, dan fenol*). Setelah itu



diinkubasi selama 1 jam untuk menghasilkan warna dan warna yang terbentuk ditentukan absorbansinya dengan spektrofotometer pada 505 nm. Persen inhibisi dihitung dengan mengacu pada Kurihara *et al.* (1994), melalui persamaan matematisnya sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_k - A_d - A_u}{A_k} \times 100\%$$

Dimana, % inhibisi = persen inhibisi ekstrak sampel pada aktivitas enzim  $\alpha$  glukosidase

A<sub>k</sub> = absorbansi larutan kontrol

A<sub>d</sub> = absorbansi larutan dasar

A<sub>u</sub> = absorbansi larutan uji

#### **3.4.9 Hidrolisis Enzimatik Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*)**

Protein biji melinjo yang mempunyai aktivitas antioksidan dan aktivitas penghambatan enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase kemudian dilakukan hidrolisis protein biji melinjo menggunakan alkalase yang telah diencerkan 10X dari stok alkalase 24 LFG menggunakan 0.2 M buffer fosfat pH 7.4. Gg-PI dengan konsentrasi 10 mg/ml dihidrolisis dengan 20  $\mu$ l alkalase yang sudah diencerkan, kemudian diinkubasi 50<sup>0</sup>C selama 6 jam. Setelah itu dipanaskan 95<sup>0</sup>C selama 10 menit untuk menginaktivasi enzim, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5.000 rpm 15<sup>0</sup>C. Supernatan diambil dan peletnya dibuang, supernatannya disebut protein hidrolisat (Siswoyo dan Sugiharto, 2012).

#### **3.4.9 Fraksinasi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*)**

Fraksinasi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Protein antioksidan dimurnikan menggunakan FPLC (*fast protein liquid chromatography*). Protein terlarut sebanyak 300  $\mu$ l dimasukkan ke dalam FPLC dengan pemisahan laju alir 0.5 ml/menit dalam 50 mM bufer Na-Phospat pH 7.0 dan 50 mM NaCl. Hasil dari fraksinasi protein biji melinjo kemudian dianalisis sesuai kebutuhan.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Protein biji melinjo mempunyai kandungan antioksidan yang mampu sebagai antidiabetes terutama pada protein yang didapatkan dari biji hijau. Fraksi protein biji hijau yang efektif sebagai antioksidan dan antidiabetes adalah fraksi 5. Protein hidrolisis biji melinjo juga dapat meningkatkan kemampuan antioksidan dan antidiabetes.

### 5.2 Saran

Perlu adanya analisis lebih lanjut untuk menentukan peptida yang berfungsi sebagai antioksidan terutama pada biji hijau.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Bender, D.A. 2003. *Introduction to Nutrition and Metabolism*. 3rd ed. Taylor and Francis. London
- Bhat, R., dan Yahya, N. 2014. Evaluating Belinjau (*Gnetum gnemon L.*) Seed Flour Quality as a Base for Development of Novel Food Products and Food Formulations. *Food Chemistry*.156: 42-49.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.
- Chikezie, P.C, Chiedozi, O.I., Odinakachi, S.M., Ferdinand, N.M., dan Chibuikwe UN (2016). Amino Acid Profiles, Total Nitrogen Contents, and Computed-protein Efficiency Ratios of Manihot Esculenta Root and Dioscorea Rotundata Tuber Peels. *Journal of Food Processing*. 1: 8-15.
- Damrongsakkul, S., Ratanathampan, K., Komolpis, K., dan Tanthapanichakoon, W. 2008. Enzymatic Hydrolysis of Rawhide using Papain and Neutrase. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 14: 202-206.
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods In Enzimology, Guide to Protein Purification*. Toronto: Academic Press, Inc.
- Droge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Review*. 87: 47-95.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., dan Decker, E.A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 48: 430-441.
- Erdoş dan Skidgel. 1987. The angiotensin I-converting Enzyme. *Lab Invest: a Journal of Technical Methods and Pathology*, 56: 345-348.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., dan Arouma, O.I. 1987. The Deoxyribose Method: a Simple Test Tube Assay for the Determination of Rate Constants for Reactions of Hydroxyl Radicals. *Analytical Biochemistry*. 165: 215-219.
- Hashim A, Khan MS, Khan, MS, Baig MH and Ahmad S (2013). Antioxidant and Amylase Inhibitory Property of *Phyllanthusvirgatus L.* : an *In Vitro* and Molecular Interaction Study. *Biomed Research International*, 1-12.

- Hilmi, Y., Muna, F.A., Haidar, A., Assad, K., dan Hassan, K. 2014. A Study of Antioxidant Activity, Enzymatic Inhibition and In Vitro Toxicity of Selected Traditional Sudanese Plants with Anti-diabetic Potential. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 149-158.
- Hu, Gary. 2014. Understanding the Fundamentals of Peptides and Proteins. *BioProsesing Journal*. 10: 12-14.
- Indraswari, Wiwi. 2010. *Hubungan Indeks Glikemik Asupan Makanan Dengan Kadar Glukosa Darah Pada Pasien Rawat Jalan Diabetes Mellitus Tipe-2 Di Rsup Dr. Wahidin Sudirohusodo*. Skripsi Sarjana. Program Studi Ilmu Gizi, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Jafar, Nurhaedar. 2011. *Sindrom Metabolik*. Disertasi. Makasar : Program Studi Ilmu Gizi FKM UNHAS.
- Kowluru, R.A., Tang, J., dan Kern, T.S. 2001. Abnormalities of Retinal Metabolism in Diabetes and Experimental Galactosemia. VII. Effect of Long-term Administration of Antioxidants on the Development of Retinopathy. *Diabetes*. 50: 1938-1942.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lehninger, A.L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*, Jilid 1, Alih bahasa. Maggi Thenawijaya, Erlangga, Jakarta.
- Lobo, V. A., Patil, A., Phatak., dan N. Chandra. 2010. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on human health. *Pharmacogn Review*. 4: 118-126.
- Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., dan Chen, C. 2010. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *Journal of cellular and molecular medicine*. 14: 840-860.
- Luo, X., Liu, T., Yuan, X., Ge, S., Yang, J., dan Li, C. 2015. Factors Influencing Self-Management in Chinese Adults with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 12: 11304-11327.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H., dan Pretorius I.S. 2002. Microbial Amylase Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66: 506-517.

- Manaharan, T., Appleton, D., Cheng, H.M., dan Palanisamy., U.D. 2011. Flavonoids Isolated from *Syzygium Aqueum* Leaf Extract as Potential Antihyperglycaemic Agents. *Food Chemistry*. 61: 1802-1807.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., dan Watkins, J.B. 2003. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol*, 17: 24-38.
- Masoud, A., Mohammad, A.G., Fatima, A.F., Anisah, A.M., Abdulalim, A.S., Abdul, R.H., Majdaldeen, A.S., Reham, A.A., dan Sali, A.M. 2017. Antioxidant Effect of Frankincense Extract in the Brain Cortex of Diabetic Rats. *Journal of the Association of Arab*. 24: 95-100.
- Muhamyankaka, V., Shoemaker, C.F., Naiwoga., M. dan Zhang X.M. 2013. Physicochemical Properties of Hydrolysates from Enzymatic Hydrolysis of Pumpkin (*Cucurbita Moschata*) Protein Meal. *International Food Reaserch Journal*. 20: 2227-2240.
- Murray, R. Granner, D. Rodwell, V. *Biokimia Harper Ed. 27*. Terjemahan oleh Brahm U. P. 2009. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Niwa, A., Tajiri, T., and Higashino, H. 2011. Ipomoea batatas and Agarics blazei Ameliorate Diabetic Disorders with Therapeutic Antioxidant Potential in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *J. Clin. Biochem. Nutr*, 48 (3), 194-202.
- Oh, N.S., Lee, J.Y., Joung, K.B., Lee, Y., Kim, K.W., Lee., dan Kim, S.H. 2013. The Dual Effect of Maillard Reaction and Enzymatic Hydrolysis on the Antioxidant Activity of Milk Protein. *Journal Dairy Science*. ADSA.
- Peksa, A., dan Miedzianka. 2014. Amino Acid Composition of Enzymatically Hydrolysed Potato Protein Preparations. *Czech Journal Food Science*. 32: 265-272.
- Prameswari, O.M., dan Widjanarko, S. B. 2014. Uji Efek Ekstrak Air Daun Pandan Wangi Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah dan Histopatologi Tikus Diabetes Mellitus. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2: 16-27.
- Rahbani-Nobar, M.E., Rahimi-Pour, A., Rahbani-Nobar, M. 1999. Total Antioxidant Capacity, Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Diabetic Patients. *Medicinal Journal of Islamic World Acad Science*. 12: 109-114.
- Re, N.P., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., dan Rice-Evans. 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237.

- Rohdiana, D. 2001. Aktivitas Daya Tangkap Radikal Polifenol Dalam Daun Teh. *Majalah Jurnal Indonesia*. 12: 53-58.
- Rohmatussolihat. 2009. Antioksidan, Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia. *BioTrends*. 4: 12-18.
- Subroto, A., .2006. *Ramuan Herbal untuk Diabetes Melitus*. Depok: Penebar Swadaya.
- Shahidi, F., dan Zhong, Y. 2008. Bioactive Peptides. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry*. 91: 914-931.
- Shinde, J., Taldone, T., Barletta, M., Kunaparaju, N., Bo, H., dan Kumar, S. 2008. Alpha Glukosidase Inhibitory Activity of *Syggium cumini* (Linn) Skeels seed Kemel in Vitro Goto-Kakizaki (GK) rats. *Carbohydrate Reseaech*. 243: 1278-1281.
- Siswoyo, T.A. dan Aldino, M. 2007. Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content of Melinjo Tree (*Gnetum gnemon* L.). *International Conference of Chemistry Science*. Yogyakarta: UGM.
- Siswoyo, T.A., dan Hosokawa, K. 2014, May 2017. *Scavenging Hydroxyl Radical Activity and DNA Damage Protective Effect of Hydrolyzed Protein Isolat from Melinjo Seeds (Gnetum gnemon)*. Paper Presented at the 4<sup>th</sup> Asian Pasific Protein Association (APPA) Confrence, Jenju. Korea.
- Siswoyo, T.A., Eka, M., Lee, K.O., dan Hosokawa, K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seed. *Agricultural and Food Chemistry*, 59: 5648–5656.
- Siswoyo, T.A., Oktaviandari, P. dan 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*.
- Socha, P., Raždíková, A. dan Urmínská, D. 2010. Optimization Ofceliac Disease Active Protein Sestimationincereals and Pseudocereals. *Potravinarstvo*. 4: 497-505.
- Sujith, P.A., dan Hymavaty, T.V. 2011. Recent Development with Debittering of Protein Hydrolysates. *Asian Journal Food Agro-Industry*. 4: 365-381.
- Tang, X., He, Z., Day, Y., Xiong, Y.L., Xie, M., dan Chen, J. 2010. Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58: 587-593.



- Tjokroprawiro, Askandar. 2007. *Ilmu Penyakit Dalam*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Trisha, L., Pownall., Chibuike, C., Udenigwe., dan Rotimi, E.A 2010. Amino acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisumsativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58: 4712-4718.
- Tursiman, P., Ardiningsih dan R. Nofiani. 2012. Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume). *JKK*. 1: 45-48.
- Ueno, Y., Kizaki, M., Nakagiri, R., Kamiya, T., Sumi, H., dan Osawa, T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *Journal of Nutrition*. 132: 897-900.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Penerbit Kansius.
- Xu Na., Guanqun, C., dan Hui, L. 2017. Antioxidative Categorization of Twenty Amino Acids Based on Experimental Evaluation. *Molecules*. 22: 2-8.
- Yang, P., Chen, H., Liang, Y., dan Shen S. 2007. Proteomic analysis of de-etiolated rice seedlings upon exposure to light. *Proteomics*. 7: 2459-2468.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., dan Yang, B. 2009. Effect of Degree of Hydrolysis on the Antioxidant Hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 235-240.
- Zhang, J.F., Zheng, Y.G dan Shen, Y.C. 2007. Inhibitory Effect of Valienamine on the Enzymatic Activity of Honeybee (*Apis Cerana Fabr*) Alpha-glucosidase Pesticide Biochemistry and Physiology. 87: 73-77
- Zhang, P., Geng, M., Chenyang, W., Hongfang, L., Shasha, L., Yingxin, X., Dongyun, M., Yunji, Z., dan Tiancai, G. 2017. Effect of Irrigation and Nitrogen Application on Grain Amino Acid Composition and Protein Quality in Winter Wheat. *Plos One*. 12: 1-5.
- Zia-Ul-Haq, M., Cavar, S., Qayum, M., Khan, I., dan Ahmad, S. 2013. Compositional Studies and Antioxidant Potential of *Acacia Leucophloea Roxb*. *Acta Botanica Croatica*. 72: 27-31.

**Lampiran A. Kandungan asam amino (g/100 g protein) protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*) berdasarkan tingkat maturasi.**

Amino Acid	Hijau	Kuning	Merah
Aspartic Acid (Asp)	10815,35	7172,59	12872,13
Thereonin (Thr)	5589,22	5088,68	6585,64
Serin (Ser)	6654,71	6047,71	9623,55
GlutamicAcid (Glu)	19831,21	13684,49	22942,35
Proline (Pro)	4891,01	4058,62	9203,65
Glycine (Gly)	6029,91	5550,06	7933,61
Alanine (Ala)	6076,78	5170,31	7229,8
Cyteine (Cys)	734,83	693,12	1166,94
Valine (Val)	7260,9	6228,32	8450,28
Methione (Met)	1245,54	1196,12	1658,61
Isoleucine (Ile)	4774,36	4095,9	5610,18
Leucine (Leu)	8832,39	7483,89	10626,52
Tyrosine (Tyr)	6912,88	6935,95	9758,14
Phenylalanine (Phe)	4699,58	4845,9	6795,2
Histidine (His)	2038,57	1925,88	2910,35
Lysine (Lys)	7464,42	4854,16	7463,85
Arginine (Arg)	9878,02	9000,12	15943,75



**Lampiran B.1 Persentase Hasil Analisis ABTS pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Pematangan**

	Hijau								
0	0	0	0		% penghambatan			rata2	stdev
2	0,277	0,266	0,275	0,542	48,89	50,92	49,26	49,69	0,862
4	0,149	0,157	0,147	0,542	72,51	71,03	72,88	72,14	0,929
8	0,076	0,075	0,075	0,542	85,98	86,16	86,16	86,10	0,036
12	0,073	0,074	0,073	0,542	86,53	86,35	86,53	86,47	0,094
16	0,07	0,072	0,071	0,542	87,08	86,72	86,90	86,90	0,107

	Kuning				% penghambatan				
0	0	0	0					avarage	stdev
2	0,394	0,398	0,39	0,542	27,31	26,57	28,04	27,31	0,7380
4	0,308	0,316	0,307	0,542	43,17	41,70	43,36	42,74	0,9101
8	0,167	0,159	0,165	0,542	69,19	70,66	69,56	69,80	0,7681
12	0,087	0,082	0,082	0,542	83,95	84,87	84,87	84,56	0,5326
16	0,074	0,076	0,075	0,542	86,35	85,98	86,16	86,16	0,1845

	Merah				% penghambatan				
0	0	0	0					Avarage	stdev
2	0,355	0,357	0,36	0,542	34,50	34,13	33,58	34,07	0,46
4	0,284	0,281	0,29	0,542	47,60	48,15	46,49	47,42	0,85
8	0,149	0,153	0,143	0,542	72,51	71,77	73,62	72,63	0,93
12	0,089	0,09	0,093	0,542	83,58	83,39	82,84	83,27	0,38
16	0,075	0,08	0,079	0,542	86,16	85,24	85,42	85,61	0,49

**Lampiran B.2 Persentase Hasil Analisis Superoksida pada Biji Melinjo  
(*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Pematangan**

	Kontrol	0,1899	%penghambatan						
								rata	stdev
Hijau	0	0			0	0	0	0	0
	2	0,17650	0,1759	0,17793	7,06	7,37	6,30	6,91	0,55
	5	0,16730	0,16871	0,16902	11,90	11,16	11,00	11,35	0,48
	10	0,15470	0,1558	0,15768	18,54	17,96	16,97	17,82	0,79
	15	0,10877	0,10893	0,11081	42,72	42,64	41,65	42,34	0,60
	20	0,05271	0,05164	0,05323	72,24	72,81	71,97	72,34	0,43
	25	0,02864	0,02698	0,02755	84,92	85,79	85,49	85,40	0,44

Kuning				0,1899				rata	stdev
	0	0	0	0					
	2	0,17431	0,17598	0,175128	8,21	7,33	7,78	7,77	0,440
	5	0,1694	0,1698	0,1673	10,80	10,58	11,90	11,09	0,707
	10	0,161	0,15982	0,15834	15,22	15,84	16,62	15,89	0,702
	15	0,1178	0,11651	0,1159	37,97	38,65	38,97	38,53	0,511
	20	0,08125	0,0822	0,08043	57,21	56,71	57,65	57,19	0,466
	25	0,04451	0,04563	0,04301	76,56	75,97	77,35	76,63	0,692

		0,1899							
Merah								rata2	stdev
	2	0,1795	0,1799	0,1771	5,477	5,266	6,740	5,828	0,797
	5	0,1714	0,1712	0,1702	9,742	9,847	10,374	9,988	0,339
	10	0,1598	0,1578	0,1564	15,850	16,904	17,641	16,798	0,900
	15	0,1342	0,1335	0,1312	29,331	29,700	30,911	29,981	0,826
	20	0,0988	0,0962	0,0959	47,973	49,342	49,500	48,938	0,840
	25	0,0624	0,0611	0,0643	67,141	67,825	66,140	67,035	0,847

**Lampiran B.3 Persentase Hasil Analisis Hidroksil pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Pematangan**

Hijau	0	0	0	0	0	
	2	0,267	3,506	2	0,2612	5,60
	5	0,2511	9,252	5	0,2469	10,77
	10	0,2215	19,949	10	0,1992	28,01
	15	0,1801	34,911	15	0,1488	46,22
	20	0,1279	53,777	20	0,0971	64,91
	25	0,0937	66,137	25	0,0681	75,39

kuning	1,	2	3	persentase
2	0,421	5,39	0,402	9,66
4	0,398	10,56	0,356	20,00
6	0,323	27,42	0,285	35,96
8	0,282	36,63	0,229	48,54
10	0,232	47,87	0,195	56,18
15	0,192	56,85	0,142	68,09
20	0,117	73,71	0,092	79,33

merah	1	2	3	persentase
2	0,429	3,60	0,411	7,64
4	0,409	8,09	0,385	13,48
6	0,378	15,06	0,349	21,57
8	0,313	29,66	0,283	36,40
10	0,274	38,43	0,232	47,87
15	0,218	51,01	0,173	61,12
20	0,168	62,25	0,113	74,61

**Lampiran B.4 Persentase Hasil Analisis Penghambatan  $\alpha$  amilase pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Maturasi.**

	(+)	(-)			IC50	mg/ml
Kontrol	0,657	0,454	0,203		Hijau	9,34
	0,669	0,467	0,202		Kuning	17,73
	0,689	0,477	0,212		Merah	18,05
			0,206			
Hijau	0	5	10	15	20	25
(+)	0	0,198	0,228	0,297	0,305	0,495
(-)	0	0,035	0,096	0,191	0,217	0,426
	0	0,163	0,132	0,106	0,088	0,069
%tase	0	20,75	35,82	48,46	57,21	66,45
Kuning	0	0,293	0,352	0,399	0,419	0,438
(+)	0	0,123	0,197	0,268	0,305	0,345
(-)	0	0,17	0,155	0,131	0,114	0,093
%tase		17,34	24,64	36,30	44,57	54,78
Merah	0	0,282	0,33	0,384	0,401	0,428
(+)	0	0,115	0,179	0,252	0,289	0,336
(-)	0	0,167	0,151	0,132	0,112	0,092
%tase		18,80	26,58	35,82	45,54	55,27

**Lampiran C. Persentase Hasil Analisis Penghambatan  $\alpha$  glukosidase pada Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Tingkat Pematangan.**

Hijau	(+)	(-)	Selisih	persentase
5	0,738	0,18	0,558	28,98
10	0,632	0,297	0,335	57,36
15	0,628	0,315	0,313	60,16
20	0,648	0,49	0,158	79,89
25	0,636	0,512	0,124	84,22

Kuning	(+)	(-)	Selisih	persentase
5	0,821	0,158	0,663	15,61
10	0,787	0,22	0,567	27,83
15	0,789	0,29	0,499	36,49
20	0,845	0,391	0,454	42,21
25	0,815	0,479	0,336	57,23

Merah	(+)	(-)	selisih	persentase
5	0,873	0,241	0,632	19,56
10	0,732	0,152	0,58	26,18
15	0,776	0,327	0,449	42,85
20	0,791	0,399	0,392	50,11
25	0,783	0,416	0,367	53,29



Lampiran C. Publikasi Jurnal International Current Research In Nutrition and Food Science

