



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SECARA *IN VITRO* DAN KEMAMPUAN  
PROTEKSI TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI  
PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)**

**SKRIPSI**

Oleh

**Tri Aji Pujo Sembodo  
NIM 112010101049**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SECARA *IN VITRO* DAN KEMAMPUAN  
PROTEKSI TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI  
PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Tri Aji Pujo Sembodo  
NIM 112010101049**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, yang telah memberikan limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya mendapat kesempatan untuk hidup dan menuntut ilmu, beserta Nabi Muhammad SWA yang menjadi tauladan saya;
2. Keluarga saya Ibu Yuliningsih, S.Pd, Bapak Suwanto, Mama Sulistyaning Astuti, SH dan Papa Slamet Hariyanto, serta kedua kakakku Kukuh Kurniadi Basuki, SE dan Daniati Yuliasutiningsih, SE;
3. Guru-guru dan dosen yang telah mendidik dan memberikan ilmunya dengan tulus sedari taman kanak-kanak hingga di perguruan tinggi;
4. Keluarga besar Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan saudara seangkatan CARDIO FK 2011 serta almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
5. *Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST)* Universitas Jember
6. Bangsa dan Tanah Airku Indonesia.

**MOTO**

“...tetapi boleh jadi kamu tidak menyenangi sesuatu, padahal itu teramat baik bagimu, dan boleh jadi kamu menyukai sesuatu, padahal itu buruk bagimu. Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.”

(terjemahan QS: Al-Baqarah: 216\*)

---

\*) Departemen Agama RI. 2011. Mushaf Al-Quran Terjemahan. Jakarta: Al-Mizan

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Tri Aji Pujo Sembodo

NIM : 112010101049

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah dengan judul “UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SECARA *IN VITRO* DAN KEMAMPUAN PROTEKSI TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi 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 sebenar-benarnya tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan tersebut tidak benar.

Jember, 26 Maret 2015

(Tri Aji Pujo Sembodo)  
NIM 112010101049

**SKRIPSI**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SECARA *IN VITRO* DAN KEMAMPUAN  
PROTEKSI TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI  
PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*)**

Oleh

Tri Aji Pujo Sembodo

NIM 112010101049

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Uji Aktivitas Antioksidan secara *in Vitro* dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*)**” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Kamis, 26 Maret 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

Prof.Tri Agus Siswoyo,SP.,M.Agr.,Ph.D.  
NIP 197008101998031001

Dr.rer.biol.hum.dr.Erma Sulistyaningsih,M.Si  
NIP 197702222002122001

Penguji I,

Penguji II,

dr. Hairrudin, M.Kes.  
NIP 197510112003121008

Dr. dr. Aris Prasetyo, M. Kes.  
NIP 196902031999031001

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Jember

dr. Eny Suswati, M. Kes.  
NIP 197002141999032001

## RINGKASAN

**Uji Aktivitas Antioksidan secara *in Vitro* dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*); Tri Aji Pujo Sembodo; 112010101049; 2015:77 Halaman; Fakultas Kedokteran; Universitas Jember.**

Penyakit degeneratif telah menjadi segmentasi permasalahan tersendiri seiring semakin tingginya angka prevalensi di masyarakat. Peningkatan prevalensi penyakit degeneratif erat kaitannya beberapa faktor resiko seperti peningkatan usia, gaya hidup yang tidak sehat, makanan berlemak, dan paparan radikal bebas seperti sinar UV, asap rokok, dan asap kendaraan. Peranan oksigen aktif dan radikal bebas terhadap kerusakan jaringan pada tubuh telah diketahui menempati porsi yang sangat besar. Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*), termasuk didalamnya adalah radikal hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ). Radikal hidroksil diketahui memiliki peranan besar dalam inisiasi kerusakan terhadap DNA melalui mekanisme pemutusan ikatan hidrogen antar basa DNA karena karakteristik DNA memiliki bagian paling lemah pada ikatan hidrogen antar basa nitrogen, selain itu radikal hidroksil juga berperan dalam kerusakan DNA melalui proses oksidasi gugus pentosa pada deoksiribosa membentuk radikal peroksil. Paparan radikal hidroksil secara terus menerus menyebabkan fragmentasi DNA sehingga fungsi DNA menjadi abnormal. Banyak senyawa antioksidan yang telah direkomendasikan sebagai pencegahan radikal bebas, sebagai contohnya sumber antioksidan alami dari tanaman melinjo (*Gnetum gnemon L.*). Dari hasil penelitian sebelumnya melaporkan bahwa protein dari biji melinjo (Gg-PI) mempunyai potensi aktif sebagai antioksidan yang efektif untuk mengikat radikal bebas.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tahapan pemurnian protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) yang paling efektif mencegah kerusakan DNA akibat



radikal bebas yang diinduksi reaksi fenton secara *in vitro* dan uji peredaman radikal hidroksil. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental (*true experimental*). Sampel uji yang dipergunakan merupakan tiga tahapan pemurnian protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH. Konsentrasi larutan uji 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; dan 10 µg/mL dalam pengujian aktivitas peredaman radikal hidroksil (OH) dan konsentrasi larutan uji 15 µg dalam pengujian kemampuan proteksi biji melinjo terhadap kerusakan DNA dalam gel *agarose* 1%. Data yang diperoleh berupa persen (%) peredaman radikal hidroksil dan nilai IC<sub>50</sub> yang menunjukkan kemampuan sampel uji dalam menghambat radikal hidroksil sebanyak 50%, serta hasil transiluminasi UV pengujian degradasi deoksiribosa dalam gel *agarose* 1% yang menunjukkan perbandingan bentuk pita DNA *supercoiled*, *open circular*, dan *linear*. Analisis data menggunakan uji normalitas, selanjutnya diuji dengan uji korelasi sederhana bivariat untuk melihat hubungan antara variable bebas terhadap variable terikat. Kemudian uji dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* jika data terdistribusi normal dan homogen.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan terdapatnya efek proteksi terhadap kerusakan DNA dan kemampuan meredam radikal hidroksil dari sampel uji protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Kemampuan paling besar dalam meredam radikal hidroksil ditunjukkan oleh protein terhidrolisis biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.). Semakin tinggi konsentrasi protein biji melinjo maka aktivitas peredaman radikal hidroksil juga semakin besar. Protein terhidrolisis (Gg-PH) biji melinjo juga kemampuan paling besar dalam melindungi DNA dari kerusakan.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah karakter protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) memiliki aktivitas peredaman radikal hidroksil paling tinggi diantara tahapan pemurnian protein lainnya, ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 4,4 ± 0,2 µg/mL serta memiliki kemampuan melindungi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil.

## PRAKATA

Puji Syukur atas ridho dan rahmat yang diberikan oleh Allah S.W.T sehingga penelitian dengan judul “Uji Aktivitas Antioksidan Secara *in Vitro* dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*)” dapat terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak terdapat kekurangan dan kelemahan, baik dari teknik penulisan maupun materi.

Dalam proses pembuatan skripsi ini sangat banyak pihak yang membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karenanya penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M. Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran, Universitas Jember;
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang dengan penuh kesabaran memberi banyak pengarahan dalam penyelesaian skripsi;
3. Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyarningsih, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dengan ketekunan dan kesabarannya dalam meluangkan segenap waktunya untuk membimbing saya;
4. dr. Hairrudin, M.Kes dan Dr. dr. Aris Prasetyo, M. Kes selaku penguji yang memberi kritik, saran, dan masukkan dalam penyelesaian Karya Tulis Ilmiah ini;
5. dr. Nugraha Wahyu Cahyana, Sp. M.; dr. Frida Lorita Hafidasari; dr. Hairrudin, M.Kes; dan dr. Dian Kusumaningrum selaku dosen-dosen Pembimbing Akademik;
6. dr. Sugiyanta, M.Ked, selaku koordinator Tim KTI Fakultas Kedokteran Universitas Jember;

7. Segenap Dosen Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah membagi ilmu pengetahuan selama ini;
8. Keluarga kandung saya yaitu Bapak Suwanto dan Ibu Yuliningsih, S.Pd., serta kakak-kakakku Kukuh Kurniadi Basuki, SE dan Daniati Yuliasutiningsih, SE;
9. Keluarga Angkat saya, Mama Sulistyaning Atutik, SH dan Papa Slamet Hariyanto, yang telah membantu baik moril dan materiil, mendoakan, mendidik, dan memberi kasih sayang serta pengorbanan yang tidak terhingga selama ini;
10. Keluarga Besar Fakultas Kedokteran Angkatan 2011 “CARDIO FK 2011”, atas semangat, dukungan dan motivasi yang kalian berikan. Kebersamaan dan kenangan ini tak akan pernah terlupakan;
11. Sahabat seperjuangan FK Natasha Amelia, Chikita Rizki Hanifati, Thallita Rahma, Adimas Putra Firdaus, Renno Dhany, Radityo Priambodo, Annisa Kinanti, Fairuztya Naila, Chyntia Damayanti, Nastiti Putri, dan Vina Nadia;
12. Segenap anggota Divisi Neuraseutikal dan Farmaseutikal *Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST) “Melinjo Group”* yang telah mendukung dan senantiasa membantu dalam proses penelitian. Serta teman-teman seperjuangan dalam menyelesaikan skripsi Robitha Kartika Sari, Andhy Isra Biby, Ria Nathania Mahasiwi, A. Nuriyah, Dede Abdillah, Rony Setiawan, Adi Rahmat, Rio Azimah, dan Bayu Darmawan;
13. Keluarga *Gyeongsang National University (GNU) Winter Camp 2015 South Korea*, Mr. Kim-Haedong, Mr. Pei-Dayong, Rifka Valdya, Ria Nathania Mahasiwi, Zahrina Eka Amalia, Febri Ramadhan, Anissa Zahra, dan Vandi Purbantoro, serta sahabat lainnya yang telah memberikan pengalaman tak terlupakan dalam masa penyelesaian skripsi saya;

14. Sahabat terbaik saya, Syaiful Sofyan, ST yang selalu ada dan memberikan banyak bantuan;
15. Semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan baik secara moril maupun materi hingga terselesaikannya penulisan Karya Tulis Ilmiah ini;

Jember, 26 Maret 2015

Penulis



**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xviii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	4
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Penyakit Degeneratif</b> .....	5
<b>2.2 Radikal Bebas</b> .....	6
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas dalam Tubuh Manusia .....	9
2.2.2 Mekanisme Radikal Bebas dalam Merusak Biomembran .....	11
<b>2.3 Kerusakan DNA</b> .....	14
<b>2.4 Melinjo (<i>Gnetum gnemon L.</i>)</b> .....	16

<b>2.5</b>	<b>Antioksidan</b> .....	17
<b>2.6</b>	<b>Protein</b> .....	18
	2.6.1 Hidrolisis Asam.....	20
	2.6.2 Hidrolisis Basa.....	20
	2.6.3 Hidrolisis Enzimatik.....	20
<b>2.7</b>	<b>Analisis Kuantitatif Protein</b> .....	22
<b>2.8</b>	<b>Penentuan Aktivitas Antioksidan secara In vitro</b> .....	23
	2.8.1 Uji Peredaman Radikal ABTS.....	23
	2.8.2 Uji Peredaman Radikal Hidroksil.....	23
<b>2.9</b>	<b>Elektroforesis</b> .....	25
<b>2.10</b>	<b>Kerangka Konseptual</b> .....	28
<b>2.11</b>	<b>Hipotesis Penelitian</b> .....	28
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	29
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian</b> .....	29
<b>3.2</b>	<b>Rancangan Penelitian</b> .....	29
<b>3.3</b>	<b>Sampel Penelitian</b> .....	30
<b>3.4</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	30
<b>3.5</b>	<b>Alat dan Bahan</b> .....	30
	3.5.1 Alat.....	30
	3.5.2 Bahan.....	30
<b>3.6</b>	<b>Variabel Penelitian</b> .....	31
	3.6.1 Variabel Bebas.....	31
	3.6.2 Variabel Terikat.....	31
	3.6.3 Variabel Kendali.....	31
<b>3.7</b>	<b>Definisi Operational</b> .....	31
<b>3.8</b>	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	32
	3.8.1 Ekstraksi Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.).....	32
	3.8.2 Isolasi Protein Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.).....	33
	3.8.3 Pengkondisian Protein Terhidrolisis Biji Melinjo.....	33

3.8.4 Penentuan Protein Terlarut.....	33
3.8.5 Pengukuran Derajat Hidrolisis .....	34
3.8.6 Uji Peredaman Radikal ABTS.....	34
3.8.7 Pengujian Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil.....	35
3.8.8 Analisis Pola Pita Protein.....	36
3.8.9 Kultur dan Isolasi Plasmid DNA.....	36
3.8.10 Proteksi terhadap Kerusakan DNA melalui Elektroforesis Gel <i>Agarose</i> 1% .....	37
<b>3.9 Analisis Data.....</b>	<b>37</b>
<b>3.10 Alur Penelitian.....</b>	<b>39</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1 Ekstraksi Kasar Biji Melinjo (Gg-PK).....</b>	<b>40</b>
<b>4.2 Isolasi Protein Biji Melinjo (Gg-PI).....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Hidrolisis Protein Biji Melinjo (Gg-PH) dan Penentuan Derajat Hidrolisis (DH).....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Pola Pita Protein pada Elektroforesis SDS-PAGE.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Aktivitas Protein Antioksidan pada Peredaman Radikal ABTS .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6 Aktivitas Protein pada Peredaman Radikal Hidroksil.....</b>	<b>48</b>
<b>4.7 Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo.....</b>	<b>53</b>
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>56</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>56</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>57</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>65</b>

**DAFTAR TABEL**

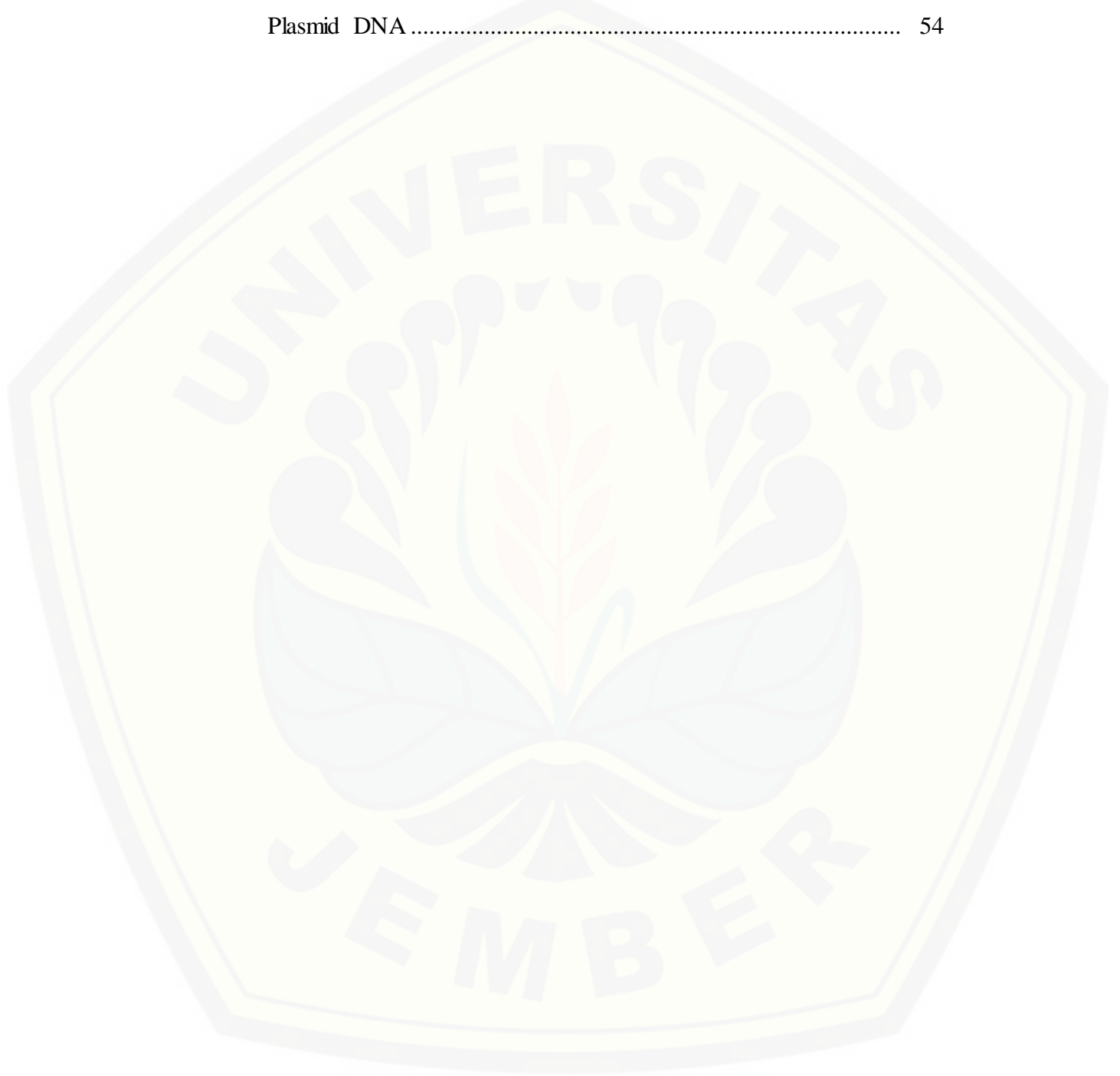
	Halaman
Tabel 2.1 <i>Radical Oxygen Species</i> .....	8
Tabel 2.2 Sumber Radikal Bebas .....	8
Tabel 2.3 Kandungan Gizi Melinjo .....	17
Tabel 4.1 Hasil Produksi Bertahap Protein Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.).....	41
Tabel 4.2 Perbandingan Pita Protein Hasil SDS-PAGE dari Sampel Protein Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.).....	44
Tabel 4.3 Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL) Protein Biji Melinjo pada Berbagai Sampel Uji	47
Tabel 4.4 Nilai IC <sub>50</sub> (µg/mL) pada Pengujian Radikal Hidroksil dari Protein Biji Melinjo.....	51



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Kimia Radikal Bebas.....	7
Gambar 2.2 Sitokrom P450 Reduktase.....	9
Gambar 2.3 Pembentukan Superoksida oleh Rantai Transport Elektron.....	10
Gambar 2.4 Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif selama Ledakan Pernafasan Fagositik oleh Makrofag, Neutrofil, dan Eusinofil.....	10
Gambar 2.5 Spesies Oksigen Reaktif dan Pembentukan Radikal Hidroksil.....	12
Gambar 2.6 Mekanisme Peroksidasi Lemak .....	13
Gambar 2.7 Cidera Sel yang Diperantarai Radikal Bebas .....	14
Gambar 2.8 Buah Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.).....	16
Gambar 2.9 Mekanisme Donor Elektron oleh Antioksidan .....	18
Gambar 2.10 Oksidasi Glutation yang Mengandung Gugus Sulfhidril .....	18
Gambar 2.11 Struktur Umum Protein.....	19
Gambar 2.12 Reaksi Reagen TNBS dengan Asam Amino.....	22
Gambar 2.13 Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	26
Gambar 2.14 Skema Elektroforesis Gel <i>Agarose</i> .....	27
Gambar 2.15 Kerangka Konseptual Penelitian .....	28
Gambar 3.1 Skema Rancangan penelitian.....	29
Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian.....	39
Gambar 4.1 Elektroforesis SDS-PAGE.....	43
Gambar 4.2 Grafik Pengaruh Pemberian Protein Biji Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.) terhadap Aktivitas Peredaman Radikal ABTS.....	46
Gambar 4.3 Reaksi Pembentukan Radikal Hidroksil melalui Reaksi Fenton..	49
Gambar 4.4 Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil (OH) (%) Protein Biji Melinjo pada Berbagai Sampel Uji.....	50

Gambar 4.5 Korelasi Peredaman Radikal ABTS dan Radikal Hidroksil.....	53
Gambar 4.6 Efek Proteksi Protein Biji Melinjo pada <i>Supercoiled pBluescript</i> Plasmid DNA .....	54



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran A. Penghitungan Kandungan Protein Biji Melinjo .....	65
Lampiran B. Aktivitas Peredaman Radikal ABTS.....	66
Lampiran C. Perhitungan Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil.....	67
Lampiran D. Perhitungan Derajat Hidrolisis.....	68
Lampiran E. Komposisi Bahan yang Digunakan dalam Penelitian.....	70
Lampiran F. Pengujian Statistik Data Penelitian.....	73
Lampiran G. Dokumentasi Penelitian .....	75
Lampiran H. Keterangan Persetujuan Etik .....	76

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit degeneratif dalam beberapa tahun terakhir telah menjadi permasalahan tersendiri seiring semakin meningkatnya prevalensi kejadian di masyarakat. Selain itu, penyakit degeneratif telah menjadi penyebab kematian terbesar di dunia. Hampir 17 juta orang meninggal lebih awal setiap tahun akibat epidemi global penyakit degeneratif (WHO, 2014). Menurut data WHO pada tahun 2014 dari 57 juta kematian yang terjadi secara global pada tahun 2014, 62% diantaranya disebabkan oleh penyakit tidak menular terutama penyakit kardiovaskular (46%), kanker (22%), paru-paru kronis (12%), dan diabetes melitus (3%). Kematian akibat penyakit tidak menular sekitar 29% terdapat pada usia di bawah 60 tahun dan hampir 80% terjadi di negara berkembang. Di Indonesia transisi epidemiologi menyebabkan terjadinya pergeseran pola penyakit. Dalam kurun waktu 20 tahun, proporsi kematian penyakit infeksi menurun secara signifikan, namun proporsi kematian karena penyakit degeneratif meningkat sekitar 49% (data Dirjen. Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI, 2013).

Peningkatan prevalensi tersebut erat kaitannya beberapa faktor resiko seperti peningkatan usia, gaya hidup yang tidak sehat, makanan berlemak, dan paparan radikal bebas seperti sinar UV, asap rokok, dan asap kendaraan. Peranan oksigen aktif dan radikal bebas terhadap kerusakan jaringan pada tubuh telah diketahui menempati porsi yang sangat besar (Maryono, 2008). Suatu senyawa radikal bebas dapat menyerang asam lemak tak jenuh pada biomembran hingga menyebabkan membran lemak mengalami peroksidasi dan dapat menurunkan fluiditas membran, menurunkan tingkat aktivitas enzim dan reseptor, menimbulkan kerusakan protein membran yang akhirnya mengarah pada inaktivasi sel, serta mampu menyerang DNA dan

menyebabkan mutasi genetik yang akhirnya mengarah kepada kanker (Felig and Lawrence, 2001; Proctor dan Reynolds, 1984; Khopkar, 2007).

Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu senyawa atau molekul yang tidak memiliki elektron berpasangan pada lapisan terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Clarkson and Thompson, 2000). Radikal bebas sangat reaktif dan bereaksi cepat dengan atom lain untuk menjadi stabil (Araujo *et al.*, 1998). Radikal bebas terpenting dalam tubuh manusia adalah radikal derivat dari oksigen (*reactive oxygen species*/ROS) yang terjadi akibat proses oksidasi oksigen dari kondisi stabil (*ground level*) menjadi senyawa aktif (*superoxide* atau *hydroperoxyde* tidak stabil), termasuk didalamnya adalah radikal hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ) (Thomas *et al.*, 2012). Radikal hidroksil merupakan spesies oksigen reaktif paling poten dan menjadi inisiator reaksi berantai yang membentuk peroksidasi lemak dan radikal organik (Marks *et al.*, 2000) Radikal hidroksil juga diketahui memiliki peranan besar dalam inisiasi kerusakan terhadap DNA melalui mekanisme pemutusan ikatan hidrogen antar basa DNA karena karakteristik DNA memiliki bagian paling lemah pada ikatan hidrogen antar basa nitrogen (Siswoyo *et al.*, 2011), selain itu radikal hidroksil juga berperan dalam kerusakan DNA melalui proses oksidasi gugus pentosa pada deoksiribosa membentuk radikal peroksil (Yu *et al.*, 2015). Paparan radikal hidroksil secara terus-menerus menyebabkan fragmentasi DNA sehingga fungsi DNA menjadi abnormal.

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat mencegah dan memperlambat kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas melalui penghambatan mekanisme oksidatif. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas tanpa merubah fungsinya (Proctor and Reynold, 2007; Rooma *et al.*, 2012). Dalam hal mencegah kerusakan DNA, antioksidan mampu mengikat radikal bebas sehingga tidak terjadi pemutusan ikatan hidrogen dalam rantai DNA.

Banyak senyawa antioksidan yang telah direkomendasikan sebagai pencegahan radikal bebas, sebagai contohnya sumber antioksidan alami dari tanaman

melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia, dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya. Pada tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) kadar antioksidan yang tinggi terutama ditemukan pada biji melinjo. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terdiri dari 58% pati, 16.4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo, *et al.*, 2007). Kandungan protein pada biji yang relatif sangat besar merupakan suatu potensi sebagai sumber protein fungsional alami. Protein dari biji melinjo (Gg-PI) mempunyai potensi aktif sebagai antioksidan yang efektif untuk mengikat radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit seperti hipertensi, kolesterol tinggi, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain (Siswoyo *et al.*, 2012).

Banyak metode untuk menentukan aktivitas antioksidan diantaranya uji peredaman radikal ABTS dan uji peredaman radikal hidroksil. Uji peredaman ABTS digunakan untuk *general screening* potensi antioksidan, sementara uji peredaman radikal hidroksil dipilih karena radikal hidroksil yang paling reaktif dan menyebabkan kerusakan berat pada biomolekul, serta reaksi fenton yang digunakan sebagai penghasil radikal bebas memiliki kesamaan model dalam perusakan DNA pada tubuh manusia (Halliwell *et al.*, 1987; Kumar *et al.*, 2013). Sedangkan kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA dinilai dari pencegahan perubahan morfologi SC (*super coiled*) plasmid DNA menjadi OC (*open circular*) plasmid DNA yang diinisiasi ROS dari reaksi fenton (Arnao *et al.*, 2000) yang dianalisis melalui elektroforesis gel *agarose* 1%.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dari protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dan kemampuan proteksinya terhadap kerusakan DNA.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan di atas, maka permasalahan yang akan dibahas dalam penulisan skripsi ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana karakter protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dalam beberapa tahapan pemurnian protein pada uji peredaman radikal hidroksil berdasarkan perbedaan konsentrasi?
2. Bagaimana kemampuan proteksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap kerusakan DNA?

### 1.1 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui karakter protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dalam beberapa tahapan pemurnian protein pada uji peredaman radikal hidroksil berdasarkan perbedaan konsentrasi yang diberikan.
2. Mengetahui kemampuan proteksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap kerusakan DNA.

### 1.2 Manfaat Penelitian

1. Sebagai informasi kepada masyarakat tentang protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai zat antioksidan alami
2. Memberikan sumbangan pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran terutama di bidang biokimia serta mengembangkan protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai bahan *nutraceutical* komersial yang berbasis protein.
3. Sebagai bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Penyakit Degeneratif

Penyakit degeneratif adalah istilah yang secara medis digunakan untuk menerangkan adanya suatu proses kemunduran fungsi tanpa sebab yang diketahui, yaitu dari keadaan normal sebelumnya ke keadaan yang lebih buruk. Penyebab penyakit sering tidak diketahui, termasuk diantaranya kelompok penyakit yang dipengaruhi oleh faktor genetik.

Hampir 17 juta orang meninggal lebih awal setiap tahun akibat epidemi global penyakit degeneratif (WHO, 2014). Menurut data WHO pada tahun 2014 dari 57 juta kematian yang terjadi secara global pada tahun 2014, 62% diantaranya disebabkan oleh penyakit tidak menular terutama penyakit kardiovaskular (46%), kanker (22%), paru-paru kronis (12%), dan diabetes melitus (3%). Kematian akibat penyakit tidak menular sekitar 29 % terdapat pada usia di bawah 60 tahun dan hampir 80% terjadi di negara berkembang.

Menurut Badan Kesehatan Dunia (WHO), kematian akibat Penyakit Tidak Menular (PTM) diperkirakan akan terus meningkat di seluruh dunia, peningkatan terbesar akan terjadi di negara-negara menengah dan miskin. Lebih dari dua pertiga (70%) dari populasi global akan meninggal akibat penyakit tidak menular seperti kanker, penyakit jantung, stroke dan diabetes. Dalam jumlah total, pada tahun 2030 diprediksi akan ada 66 juta jiwa kematian per tahun karena penyakit tidak menular, naik 9 juta jiwa dari 57 juta jiwa pada saat ini. Di sisi lain, kematian akibat penyakit menular seperti malaria, TBC atau penyakit infeksi lainnya akan menurun, dari 18 juta jiwa saat ini menjadi 16,5 juta jiwa pada tahun 2030. Pada negara-negara menengah dan miskin PTM akan bertanggung jawab terhadap tiga kali dari tahun hidup yang hilang dan *disability (Disability adjusted life years (DALYs))* dan hampir lima kali dari kematian penyakit menular, maternal, perinatal dan masalah nutrisi



(Riskasdas DepKes RI, 2014). Indonesia dalam beberapa dasawarsa terakhir menghadapi masalah *triple burden diseases*. Di satu sisi, penyakit menular masih menjadi masalah ditandai dengan masih sering terjadi KLB beberapa penyakit menular tertentu, munculnya kembali beberapa penyakit menular lama (*re-emerging diseases*), serta munculnya penyakit-penyakit menular baru (*new-emergyng diseases*) seperti HIV/AIDS, Avian Influenza, Flu Babi dan Penyakit Nipah. Di sisi lain, PTM menunjukkan adanya kecenderungan yang semakin meningkat dari waktu ke waktu. Di Indonesia transisi epidemiologi menyebabkan terjadinya pergeseran pola penyakit. Dalam kurun waktu 20 tahun, proporsi kematian penyakit infeksi menurun secara signifikan, namun proporsi kematian karena penyakit degeneratif meningkat sekitar 49% (data Dirjen. Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI, 2013).

Beberapa teori yang menunjukkan proses awal dan faktor terjadinya penyakit degeneratif di dalam tubuh manusia (Handajani *et al.*, 2009)

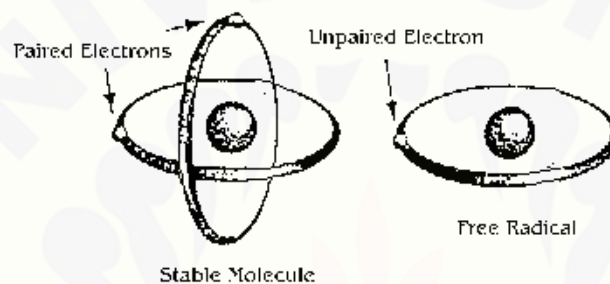
- 1 Adanya hubungan antara transisi demografi, epidemiologi, dan kesehatan.
- 2 Perubahan metabolisme tubuh yang ditandai penurunan produksi hormon testosteron untuk laki-laki dan estrogen untuk perempuan biasanya mulai tampak pada usia 65 tahun ke atas.
- 3 Pergeseran pola penyakit dari penyakit infeksi ke penyakit non-infeksi (degeneratif) adalah akibat adanya pergeseran pola makan dan pola hidup.
- 4 Kelebihan gizi yang mengakibatkan tingginya prevalensi penyakit degeneratif sudah dirasakan negara-negara berkembang termasuk Indonesia.
- 5 Paparan radikal bebas diketahui memegang peranan dalam terjadinya penyakit degeneratif.

## 2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas (Bahasa Latin: *radicalis*) adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya. Radikal bebas sangat reaktif dan mempunyai spesifitas kimia yang rendah

sehingga dapat bereaksi dengan berbagai molekul lain seperti protein, lemak, karbohidrat, dan *Deoxy Nucleic Acid* (DNA) (Girindra, 2000).

Dalam rangka mendapatkan stabilitas kimia, radikal bebas tidak dapat mempertahankan bentuk asli dalam waktu lama dan segera berikatan dengan atom sekitarnya. Radikal bebas akan menyerang molekul stabil terdekat dan mengambil elektron, atom/molekul yang terambil elektronnya menjadi radikal bebas sehingga akan memulai suatu reaksi berantai (Proctor dan Reynolds, 1984).



Gambar 2.1 Struktur kimia radikal bebas (Girindra, 2000)

Menurut Araujo dan Arnal (1998), Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species/ROS*), termasuk didalamnya adalah triplet ( $^3\text{O}_2$ ), tunggal (singlet/ $^1\text{O}_2$ ), anion superoksida ( $\text{O}_2\bullet$ ), radikal hidroksil ( $\bullet\text{OH}$ ), nitrit oksida (NO), peroksinitrit ( $\text{ONOO}\bullet$ ), asam hipoklorus (HOCl), hidrogen peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radikal alkoksil ( $\text{LO}\bullet$ ), dan radikal peroksil ( $\text{LO}_2$ ).

Tabel 2.1 *Radical Oxygen Species*

<b>Kelompok oksigen reaktif</b>	
$O_2\cdot$	Radikal Superoksida ( <i>Superoxide radical</i> )
$\cdot OH$	Radikal hidroksil ( <i>Hydroxyl radical</i> )
$ROO\cdot$	Radikal peroksil ( <i>Peroxyl radical</i> )
$H_2O_2$	Hidrogen peroksida ( <i>Hydrogen peroxide</i> )
$^1O_2$	Oksigen tunggal ( <i>Singlet oxygen</i> )
$NO\cdot$	Nitrit oksida ( <i>Nitric oxide</i> )
$ONOO$	Nitrit peroksida ( <i>Peroxynitrite</i> )
$HOCl$	Asam hipoklor ( <i>Hypochlorous acid</i> )

Sumber: Widayati (2012)

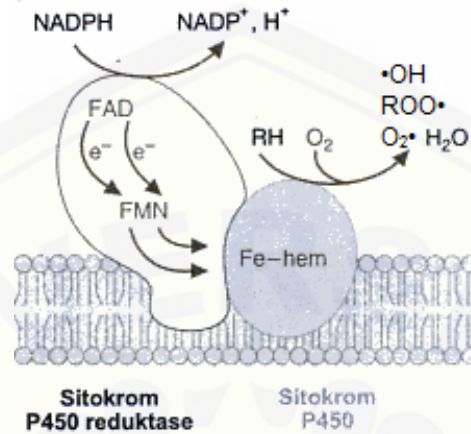
Radikal bebas dapat dihasilkan dari dalam tubuh (endogen) dan dari luar tubuh (eksogen).

Tabel 2.2 Sumber Radikal Bebas

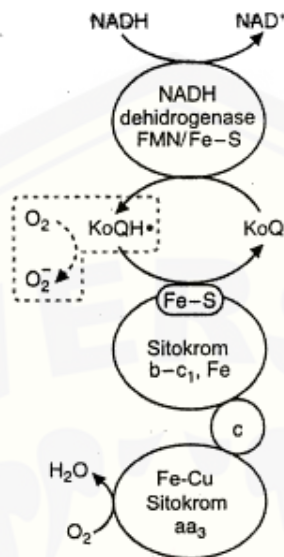
<b>Sumber Internal</b>	<b>Sumber Eksternal</b>
Mitokondria	Rokok
Fagosit	Polutan lingkungan
<i>Xantineoksidase</i>	Radiasi
Reaksi yang melibatkan besi dan logam transisi lainnya	Obat-obatan tertentu, pestisida, anestesi, dan larutan industri
<i>Arachidonat pathway</i>	Ozon
Peroksisom	
Olahraga	
Peradangan	
Iskemia/reperfusi	

Sumber: Pazil (2009)

## 2.2.1 Mekanisme Pembentukan Radikal Bebas dalam Tubuh Manusia

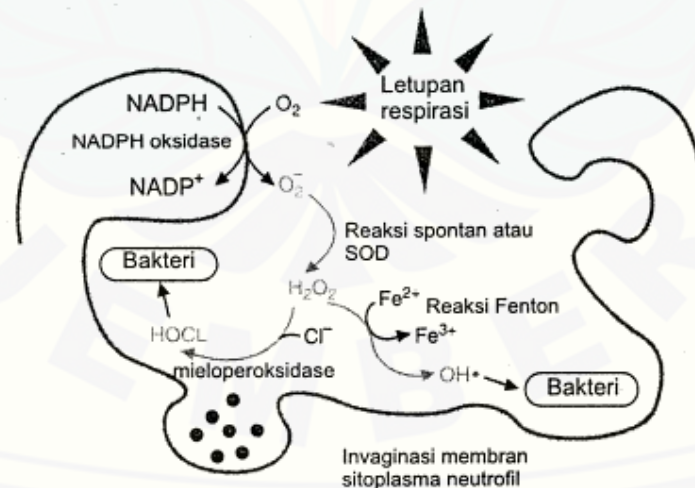
Gambar 2.2 Sitokrom P450 reduktase (Marks *et al.*, 2000)

Enzim sitokrom P450 mikrosom terdiri dari dua unit fungsional yang terbenam dalam membrane retikulum endoplasma. Sitokrom P450 dan sitokrom P450 reduktase, merupakan suatu sistem pemberi-elektron yang dependen-NADPH. Sitokrom P450 mengandung tempat ikatan untuk O<sub>2</sub> dan substrat (RH), dan sebuah Fe-hem yang serupa dengan yang terdapat pada haemoglobin “P450” menunjukkan sebuah pigmen, hem, yang menyerap sinar tampak pada panjang gelombang 450 nm. O<sub>2</sub> berikatan dengan P450 Fe-hem di tempat aktif dan diaktifkan menjadi bentuk reaktif dengan menerima elektron. Elektron diberikan oleh sitokrom P450 reduktase, yang mengandung sebuah FAD ditambah sebuah FMN atau Fe-S untuk mempermudah pemindahan elektron tunggal dari NADPH ke O<sub>2</sub> (Marks *et al.*, 2000)



Gambar 2.3 Pembentukan superoksida oleh rantai transport elektron (Marks *et al.*, 2000)

KoQ tereduksi di dalam rantai transport elektron mitokondria adalah sumber utama radikal bebas oksigen. Sebagian elektron yang sedang dipindahkan dari NADH dan senyawa lain ke O<sub>2</sub> “lolos” sewaktu KoQH• berinteraksi dengan O<sub>2</sub> untuk membentuk radikal superoksida. Sebaliknya, pusat Fe-Cu binuklear pada sitokrom oksidase mencegah pelepasan radikal oksigen bebas.



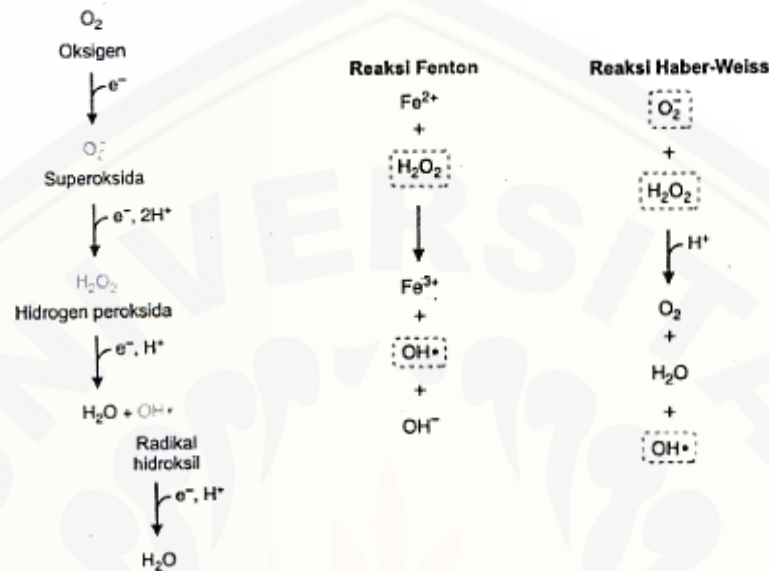
Gambar 2.4 Pembentukan spesies oksigen reaktif selama ledakan pernafasan fagositik oleh makrofag, neutrofil, dan eusinofil (Marks *et al.*, 2000)

Pembentukan spesies oksigen reaktif selama ledakan pernafasan fagositik oleh makrofag, neutrofil, dan eosinofil. Pengaktifan NADPH oksidase, yang diperkirakan terjadi di sisi sebelah luar membran plasma, mencetuskan ledakan pernafasan yang disertai pembentukan superoksida. Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga superoksida dibebaskan ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida (baik secara spontan atau secara enzimatis melalui superoksida dismutase) menghasilkan spesies reaktif lain, termasuk  $H_2O_2$  dan radikal hidroksil. Mieloperoksidase, suatu enzim yang mengandung Fe-hem dan terdapat dalam granula neutrofil, disekresikan ke dalam vakuol, tempat enzim tersebut membentuk  $HOCl$  dan halida lainnya. Hasilnya adalah serangan terhadap membran dan senyawa lain dari bakteri, dan akhirnya lisis bakteri. Proses keseluruhan disebut sebagai ledakan pernafasan karena hanya berlangsung 30-60 menit dan memerlukan  $O_2$ .

### 2.2.2 Mekanisme Radikal Bebas dalam Merusak Biomembran

Metabolit oksigen utama yang dihasilkan melalui reduksi satu-elektron oksigen adalah spesies oksigen reaktif (ROS): superoksida ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $OH\bullet$ ), dan bentuk oksigen yang tereduksi secara parsial, hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ). Radikal bebas mampu bereaksi dengan setiap molekul, menarik elektron, dan membentuk radikal bebas dalam reaksi berantai oksidatif sitotoksik. Radikal hidroksil merupakan spesies oksigen reaktif paling poten dan menjadi inisiator reaksi berantai yang membentuk peroksidasi lemak dan radikal organik. Hidrogen peroksida, walaupun bukan radikal, adalah zat pengoksidasi dan dengan adanya  $Fe^{2+}$  atau logam transisi lainnya, menghasilkan radikal hidroksil melalui reaksi Fenton. Karena larut lemak, hidrogen peroksida dapat menimbulkan kerusakan di membran lokal yang mengandung  $Fe^{2+}$  bahkan jauh dari tempat pembentukannya. Anion superoksida, yang dapat terbentuk dari  $O_2$  bebas dengan pemberian satu elektron ke radikal bebas lain, sangat reaktif tetapi memiliki kelarutan lemak terbatas dan tidak dapat berdifusi

jauh. Namun,  $O_2^-$  juga dapat menghasilkan radikal hidroksil dan hidroperoksi yang lebih reaktif melalui reaksi dengan hidrogen peroksida dalam reaksi Haber-Weiss.



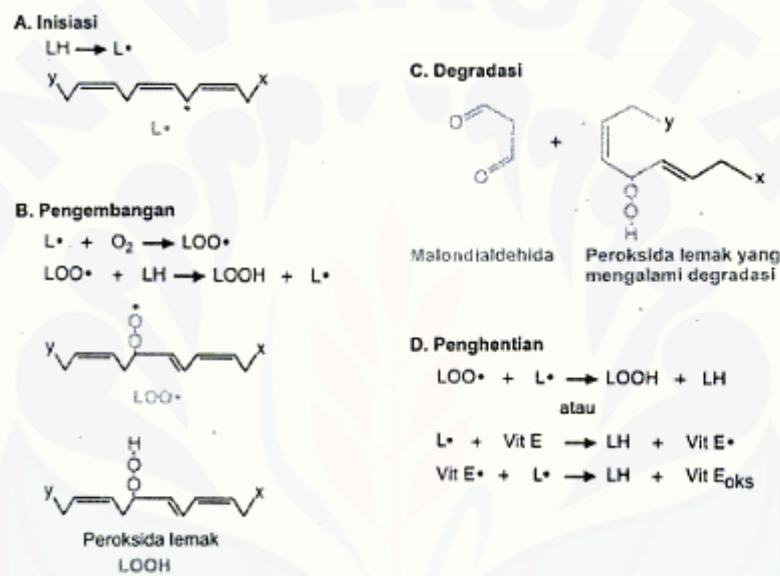
Gambar 2.5 Spesies oksigen reaktif dan pembentukan radikal hidroksil (Marks *et al.*, 2000)

Pembentukan radikal bebas lemak dan peroksida lemak dianggap sebagai ciri-ciri yang penting dalam cedera sel yang diakibatkan oleh ROS. Jenis reaksi ini, yang disebut auto-oksidasi radikal bebas, memerlukan suatu inisiator (misalnya radikal hidroksil) agar reaksi berantai dapat berjalan. Peroksidasi biasanya dimulai dengan ekstraksi atom hidrogen yang mengandung satu elektron dari ikatan rangkap terkonjugasi dalam asam lemak membentuk radikal peroksil lemak dan peroksida lemak. Asam lemak utama yang mengalami peroksidasi lemak di dalam membran sel adalah asam lemak *polyunsaturated* dengan hasil akhir degradasi lemak dan terbentuk produk seperti malondealdehid dan pentane. Malondealdehid muncul di dalam darah dan menjadi indikator kerusakan akibat radikal bebas.

Protein, lemak membran, karbohidrat, dan asam nukleat dapat menjadi target radikal bebas. Pada protein, asam amino prolin, histidin, arginin, sistein, dan metionin terutama rentan terhadap serangan radikal hidroksil dan kerusakan oksidatif. Oksidasi

asam amino dalam protein menimbulkan fragmentasi protein, pembentukan ikatan silang, dan agregasi serta kerentanan terhadap degradasi proteolitik.

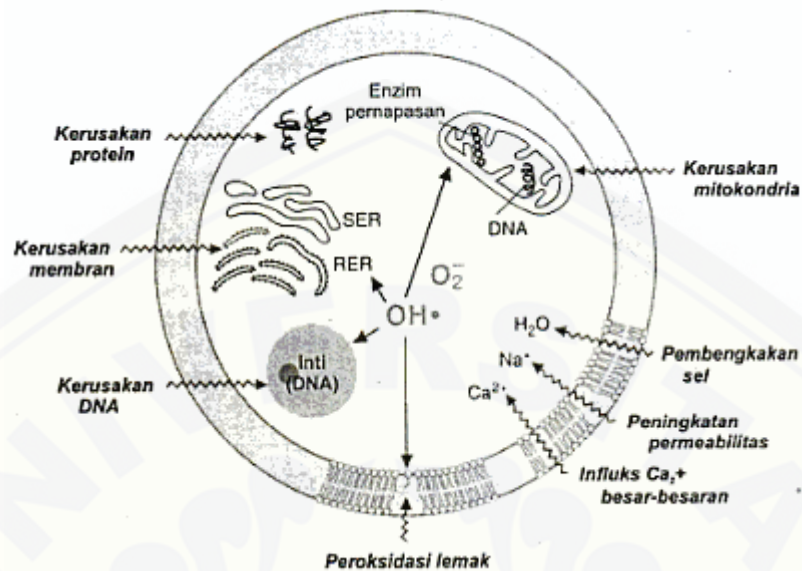
Peroksidasi molekul lemak selalu mengubah atau merusak struktur molekul lemak. Selain sifat peroksidasi lemak membran secara alami menghancurkan dirinya sendiri, aldehyd yang terbentuk dapat menimbulkan ikatan silang pada protein. Apabila lemak yang rusak adalah konstituen suatu membran biologi, susunan lapis ganda lemak dan organisasi struktural akan terganggu.



Gambar 2.6 Mekanisme peroksidasi lemak (Marks *et al.*, 2000)

Radikal bebas tanpa oksigen juga merupakan sumber utama kerusakan DNA. saat ini telah diketahui sekitar 20 jenis molekul DNA yang mengalami gangguan oksidatif. Pengikatan nonspesifik  $Fe^{2+}$  ke DNA mempermudah terbentuknya radikal hidroksil lokal setempat, yang dapat menyebabkan pemutusan untai dan perubahan basa DNA. Sampai tahap tertentu, kerusakan DNA dapat diperbaiki. Kerusakan DNA lebih lanjut dibahas pada sub bab 2.3.





Gambar 2.7 Cidera sel yang diperantarai radikal bebas (Marks *et al.*, 2000)

### 2.3 Kerusakan DNA

Kerusakan DNA adalah perubahan pada struktur kimia DNA, seperti malfungsi pada sebuah rantai DNA, hilangnya kompleks basa dari rantai DNA, atau perubahan kimia dasar seperti *8-hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG) (Khopkar, 2007). Kerusakan DNA secara alami merupakan hasil dari metabolisme atau proses hidrolisis termasuk spesies oksigen reaktif, spesies nitrogen reaktif, reaktif karbonil spesies, produk dari peroksidasi lipid dan *alkylating agent* (Martinez, 2003).

Kerusakan DNA berbeda dengan mutasi, meskipun keduanya memiliki kesalahan dalam DNA. Kerusakan DNA merupakan struktur kimia abnormal pada DNA yang merupakan tahap paling awal mutasi genetik, sedangkan mutasi adalah perubahan urutan pasangan basa standar. Kerusakan DNA dan mutasi memiliki konsekuensi biologis yang berbeda. Sebagian besar kerusakan DNA dapat mengalami perbaikan DNA tetapi perbaikan tersebut tidak 100% efisien. Kerusakan DNA yang terakumulasi dalam sel-sel non-replikasi, seperti sel-sel di otak atau otot dapat menyebabkan penuaan dini (Khopkar, 2007). Sedangkan dalam sel yang mampu bereplikasi, seperti sel-sel usus besar, kerusakan DNA yang terjadi pada template

DNA atau perbaikan yang tidak sempurna dapat berlanjut pada tahap mutasi genetik. Perubahan ini dapat mengubah fungsi gen atau regulasi ekspresi gen dan mungkin berkontribusi terhadap perkembangan kanker (Davis *et al.*, 2011).

Menurut Murray *et al.* (2003), kerusakan DNA dapat diklasifikasikan kedalam 4 jenis kerusakan, yaitu:

1. Perubahan Basa Tunggal yang terdiri dari depurinasi (hilangnya purin dasar dari DNA), deaminasi sitosin menjadi urasil, alkilasi basa serta penyisipan dan penghapusan nukleotida.
2. Perubahan Dua Basa dimer timin-timin yang diinduksi oleh cahaya UV.
3. Pemutusan Rantai terdiri dari radiasi ionisasi, disintegrasi radioaktif pada rantai DNA dan pembentukan radikal bebas yang oksidatif. Kerusakan DNA akibat paparan radikal bebas khususnya radikal hidroksil dalam waktu lama di sekitar rantai DNA yang menyebabkan pemutusan ikatan rangkap DNA (*side H*) yang berdampak pada penguraian rantai DNA dan oksidasi gugus pentosa (Thomas *et al.*, 2012)
4. Hubungan silang antara basa-basa dalam rantai yang sama atau berlawanan dan antara DNA dengan molekul protein (Histon)

Menurut Devlin dan Lin (2011), kerusakan DNA dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti tidak tersedianya senyawa kromatin kompleks yang dapat berperan sebagai pelindung dari serangan senyawa  $O_2$  reaktif, aktivitas DNA *repair* berubah dan terdapat kerusakan pada rantai transport elektron sehingga merangsang pembentukan senyawa  $O_2$  reaktif sekunder.

*Comet Assay* atau uji elektroforesis gel tunggal (*Single Gel Electrophoresis/SGE*) adalah teknik yang umum digunakan untuk menganalisis kerusakan DNA, termasuk berbagai jenis kerusakan yang telah disebutkan. Uji elektroforesis gel tunggal dilakukan sesuai dengan metode Arnao (2000) untuk menganalisis pita DNA (*Supercoiled*, *open circular*, dan *linear*), yang dijelaskan lebih lanjut pada sub bab 2.8.

## 2.4 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Klasifikasi tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menurut Cadiz and Florido (2001) adalah

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Gnetophyta
Subdivisi	: Gnetophytina
Kelas	: Gnetopsida
Subkelas	: Gnetidae
Ordo	: Gnetales
Famili	: Gnetaceae
Subfamili	: Gnetidae
Genus	: <i>Gnetum</i>
Spesies	: <i>Gnetum gnemon</i> L.



Gambar 2.8 Buah Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)  
Sumber : Cadiz and Florido (2001)

Menurut *National Tropical Botanical Garden* (2015), Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) berasal dari Asia tenggara dan pulau-pulau di Pasifik Barat termasuk Fiji, Indonesia, Malaysia, Papua Nugini, Filipina, dan Vanuatu.

Melinjo merupakan salah satu spesies tumbuhan famili Gnetaceae yang banyak tumbuh di beberapa daerah di Indonesia. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki kandungan antioksidan yang tinggi, 9-11% dalam setiap biji melinjo. Protein

utamanya efektif untuk mengikat radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit seperti hipertensi, kolesterol tinggi, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain (Siswoyo *et al.*, 2012). Melinjo juga memiliki kandungan fenolik yang tinggi pada biji sekitar 9,91 mg GAE/g ekstrak, sedangkan kandungan flavonoid tertinggi terdapat pada bagian daun sekitar 3,14 mg QE/g ekstrak (Siswoyo *et al.*, 2012).

Melinjo memiliki banyak kandungan gizi yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan gizi melinjo dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.3 Kandungan Gizi Melinjo

<b>Kandungan Unsur Gizi</b>	<b>Daun Melinjo</b>	<b>Biji Melinjo</b>	<b>Tangkil</b>
Kalori (kal)	99	345	66
Protein (g)	5,0	12,0	5,0
Lemak (g)	1,3	1,5	1,7
Karbohidrat (g)	21,3	71,5	13,3
Air (g)	70,8	13,0	80,0
Vitamin A (SI)	10.000,00	0	1.000,00
Kalsium	219	100	163

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI (1996).

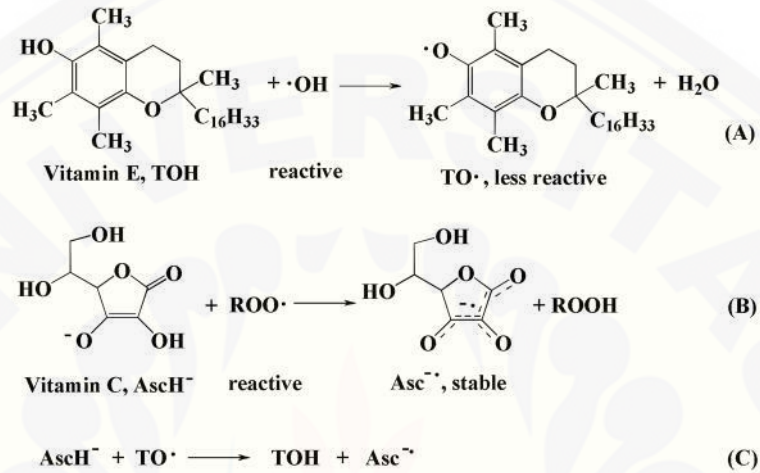
## 2.5 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah terjadinya oksidasi makromolekul, seperti lipid, protein, karbohidrat, dan DNA (Prangdimurti, 2007; Henenburg *et al.*, 2006)

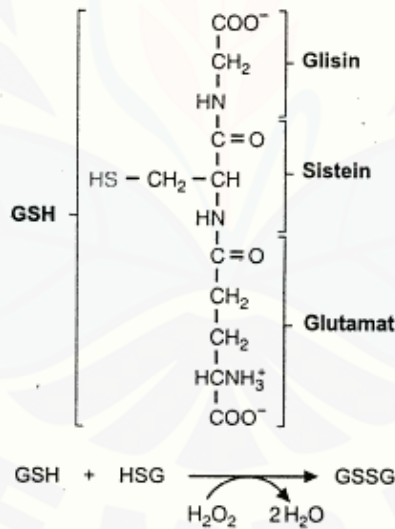
Antioksidan mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Kumalaningsih, 2006).

Penggunaan senyawa antioksidan semakin meluas seiring dengan semakin besarnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam menghambat penyakit

degeneratif seperti penyakit jantung, arteriosklerosis, kanker, serta gejala penuaan. Penggunaan senyawa antioksidan ini berkaitan dengan kemampuan antioksidan untuk bekerja sebagai inhibitor (penghambat) reaksi oksidasi oleh radikal bebas reaktif yang menjadi salah satu pencetus penyakit-penyakit di atas (Tahir *et al.*, 2003).



Gambar 2.9 Mekanisme Donor Elektron oleh Antioksidan (Ming *et al.*, 2010)

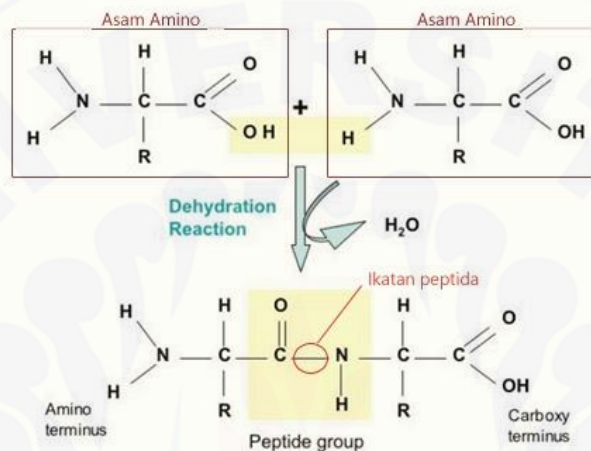


Gambar 2.10 Oksidasi glutation yang mengandung gugus sulfhidril

## 2.6 Protein

Protein merupakan polipeptida berbobot molekul tinggi yang tersusun atas beberapa asam amino yang bergabung membentuk ikatan peptida (-CONH-).

Pemisah antara polipeptida besar dan kecil biasanya berada di antara BM (berat molekul) 8000 dan 10.000. Semua asam amino (kecuali prolin) mempunyai struktur dasar yang sama, yaitu terdiri dari gugus karboksilat (-COOH), gugus amino (-NH<sub>2</sub>), gugus R sebagai gugus fungsional (*side chain*) yang menentukan sifat kimiawi protein (Jain, 2005). Struktur umum protein dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.11 Struktur umum protein (Kaiser,1997)

Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH<sub>3</sub><sup>+</sup> dan COO<sup>-</sup> dan berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida serta rusaknya struktur globular protein (Nielsen, 2010). Proses hidrolisis diharapkan memutus ikatan polipeptida dari protein menjadi peptida-peptida sehingga afinitas protein tersebut meningkat.

Menurut Sediaoetama (2000) ada tiga cara yang dapat ditempuh untuk menghidrolisis protein, yaitu hidrolisis menggunakan asam, basa dan enzim.

#### 2.6.1 Hidrolisis Asam

Hidrolisis dengan menggunakan asam kuat anorganik, seperti HCl atau H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan dipanaskan pada suhu mendidih, dapat dilakukan dengan tekanan di atas satu atmosfer, selama beberapa jam. Menurut Girindra (2000), akibat samping yang terjadi dengan hidrolisis asam ialah rusaknya beberapa asam amino (triptofan, serin, dan treonin).

#### 2.6.2 Hidrolisis Basa

Hidrolisis protein menggunakan basa merupakan proses pemecahan polipeptida dengan menggunakan basa atau alkali kuat, seperti NaOH dan KOH pada suhu tinggi, selama beberapa jam, dengan tekanan di atas satu atmosfer. Menurut Girindra (2000), serin dan treonin dapat rusak karena basa.

#### 2.6.3 Hidrolisis Enzimatik

Hidrolisis enzimatik dilakukan dengan menggunakan enzim. Dapat digunakan satu jenis enzim saja, atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Pada penambahan enzim perlu dilakukan pengaturan kondisi pH dan suhu optimal. Dibandingkan dengan hidrolisis secara kimia (menggunakan asam atau basa), hidrolisis enzimatik lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan asam amino dan asam-asam amino bebas serta peptida dengan rantai pendek yang dihasilkan lebih bervariasi, reaksi dapat dipercepat kira-kira  $10^{12}$  sampai  $10^{20}$ , tingkat kehilangan asam amino esensial lebih rendah, biaya produksi relatif lebih murah dan menghasilkan komposisi asam amino tertentu terutama peptida rantai pendek (dipeptida dan tripeptida) yang mudah diabsorpsi oleh tubuh. Menurut Reed (2000), enzim proteolitik atau enzim protease adalah enzim yang dapat memecah molekul-molekul protein dengan cara menghidrolisis ikatan peptida menjadi senyawa-senyawa yang

lebih sederhana seperti proteosa, pepton, polipeptida, dipeptida, dan sejumlah asam-asam amino

Protein dengan berat molekul yang rendah dapat diperoleh dengan menghidrolisis protein secara enzimatik (Zhidong *et al.*, 2013). Selain itu juga memiliki struktur sekunder yang lebih sedikit dari pada sebelum dihidrolisis, sehingga dapat memperbaiki fungsinya seperti meningkatnya kelarutan mendekati titik isoelektrik (Kong *et al.*, 2007), meningkatkan ketahanan terhadap panas (Molina Ortiz dan Wagner, 2002), emulsifikasi (Xiong *et al.*, 2008), dan meningkatkan pemutusan (Molina Ortiz dan Wagner, 2002), kemampuan tersebut menjadikan produk hidrolisis menguntungkan dalam aplikasi berbagai produk makanan (Muhamyankaka *et al.*, 2013). Hidrolisis protein menggunakan enzim proteolitik seperti *alcalase*, *flavorzyme*, *protamex*, dan *neutrase* yang memiliki perbedaan karakteristik pada produk hasil hidrolisisnya (Mc Carthy *et al.*, 2013; You *et al.*, 2009; Muhamyankaka *et al.* 2013).

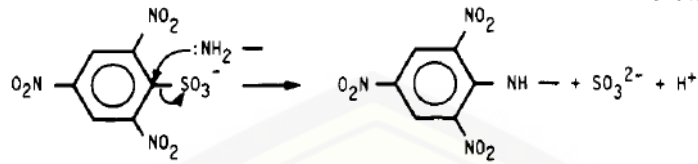
*Alcalase* adalah enzim alkaline yang diproduksi dari *Bacillus lincheniform*, menurut Adler-Nissen (1986) protein yang dihidrolisis dengan *alcalase* memiliki perolehan protein yang paling tinggi (Hoo dan Babji, 2011). Parameter untuk memonitoring reaksi hidrolisis menggunakan derajat hidrolisis (DH), merupakan parameter untuk mengetahui berapa persen ikatan peptida yang dipotong:

$$DH = h/h_{tot} \times 100\%$$

dimana  $h_{tot}$  merupakan jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein, dan  $h$  adalah jumlah ikatan hidrolisis,  $h_{tot}$  tergantung pada komposisi asam amino sebelum dihidrolisis (Nielsen, 2010).

Metode yang digunakan untuk memonitoring DH selama hidrolisis protein yaitu *trinitro-benzene-sulfonic acid* (TNBS) (Nielsen, 2010). Metode TNBS didasarkan pada reaksi primer asam amino dengan reagen TNBS membentuk kromofor yang kemudian dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Adler-Nissen, 1979). Reaksi reagen TNBS dengan asam amino ditunjukkan pada Gambar 2.3.





Gambar 2.12 Reaksi reagen TNBS dengan asam amino (Adler-Nissen, 1979)

## 2.7 Analisis Kuantitatif Protein

Metode yang sering digunakan untuk menentukan kadar protein yang didapat yaitu dengan metode Bradford. Metode Bradford merupakan suatu metode dalam penentuan kadar protein suatu bahan yang prinsip kerjanya didasarkan pada pengikatan secara langsung zat warna *Coomasie Brilliant Blue G250* (CBBG) oleh protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik (tirosin, triptofan, dan fenilalanin) atau bersifat basa (arginin, histidine, dan leusin). Reagen CBBG bebas berwarna merah kecoklatan ( $\lambda_{\text{maks}}$  465 nm), sedangkan dalam suasana basa reagen CBBG akan berbentuk anion yang akan mengikat protein membentuk warna biru ( $\lambda_{\text{maks}}$  595 nm). Jumlah CBBG yang terikat pada protein proporsional dengan muatan positif yang ditemukan pada protein (Stoscheck, 1990).

Metode Bradford banyak digunakan karena cara pewarnaannya yang praktis dan memiliki nilai sensitivitas tinggi. Metode ini dapat mendeteksi sampel yang mengandung protein kurang dari 0,01 mg/mL. Selain itu metode Bradford lebih cepat dan akurat, melibatkan langkah-langkah pencampuran yang lebih sedikit, tidak memerlukan pemanasan, dan memberikan respon kolorimetri lebih stabil dibandingkan dengan metode lain (John, 2009). Namun, respon reagen Bradford rentan terhadap pengaruh nonprotein, khususnya detergen. Respon Bradford juga bervariasi tergantung dari komposisi protein, sehingga dibutuhkan protein solusi standar (Neide et al. 2003)

## 2.8 Penentuan Aktivitas Antioksidan secara *in Vitro*

### 2.8.1 Uji peredaman Radikal ABTS

Metode ABTS menggunakan senyawa 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) sebagai sumber penghasil radikal bebas. Metode ini menggunakan prinsip inhibisi, yaitu sampel ditambahkan pada sistem penghasil radikal bebas dan pengaruh inhibisi terhadap efek radikal bebas diukur untuk menentukan total kapasitas antioksidan dari sampel (Wang *et al.*, 2009).

ABTS dihasilkan dari medium etanol yang merupakan oksidator kuat biokatalis, yang dapat dipergunakan dalam media non-aqua, sehingga metode ABTS dapat menentukan aktivitas antioksidan dari kompleks sampel hidrofilik (media buffer) dan lipofilik (media organik) (Arnao, 2000). Metode ABTS membutuhkan waktu reaksi yang lebih sedikit, lebih stabil dalam buffer, lebih sensitif, dan dapat diamati dalam rentang pH luas yang mempunyai absorbansi spesifik pada panjang gelombang region *visible* (Arnao, 2000 dalam Cano, 2007). Nilai absorbansi larutan kontrol dan sampel diukur dalam panjang gelombang  $\lambda$  734 nm (Re *et al.*, 2013).

Besarnya kemampuan peredaman ABTS radikal dinyatakan sebagai persen *scavenging*. Semakin besar nilai persen *scavenging* suatu senyawa/fraksi menunjukkan besarnya kemampuan senyawa tersebut dalam menangkap suatu radikal bebas. Pengukuran  $IC_{50}$  dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*, dimana nilai  $IC_{50}$  menunjukkan besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas sebanyak 50%.

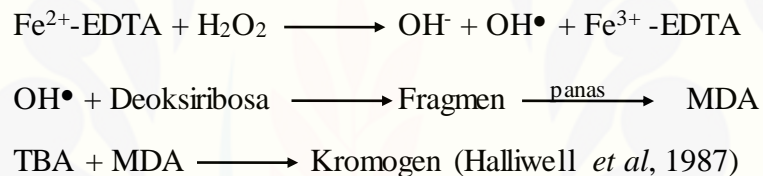
$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

Dimana  $A_{\text{control}}$  merupakan besar absorbansi tanpa sampel dan  $A_{\text{sampel}}$  merupakan besar absorbansi sampel dengan konsentrasi tertentu.

### 2.8.2 Uji Peredaman Radikal Hidroksil

Diantara spesies oksigen reaktif, radikal hidroksil adalah yang paling reaktif dan menyebabkan kerusakan berat pada biomolekul (Gutteridge, 1984 dalam

Halliwell, 2002; Kumar *et al*, 2013). Pada penelitian ini, aktivitas peredaman radikal hidroksil menggunakan reagen Fenton sebagai penghasil radikal hidroksil dan gula deoksiribosa sebagai model makromolekul yang didegradasi. Radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi antara kompleks Fe-EDTA dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan keberadaan asam askorbat (reaksi fenton). Radikal hidroksil akan mendegradasi deoksiribosa membentuk produk (fragmen-fragmen). Produk degradasi deoksiribosa oleh radikal hidroksil dapat dilihat dengan spektrofotometer visibel karena produk senyawa yang dihasilkan dari reaksi degradasi deoksiribosa dapat bereaksi dengan asam tiobarbiturat dalam suasana asam dengan bantuan pemanasan dan menghasilkan suatu produk berwarna merah muda yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum  $\lambda$  532 nm (Halliwell *et al.*, 1987).



Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas sebagai antioksidan apabila senyawa tersebut dapat memperlambat atau menghambat proses oksidasi senyawa lain (Mc Bridgeand dan Kraemer, 1999). Pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak biji melinjo dimaksudkan untuk mengetahui seberapa besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menangkap suatu radikal bebas sehingga efek negatif dari radikal bebas tersebut dapat dikurangi.

Besarnya kemampuan peredaman radikal hidroksil dinyatakan sebagai persen *scavenging*. Semakin besar nilai persen *scavenging* suatu senyawa/fraksi menunjukkan besarnya kemampuan senyawa tersebut dalam menangkap suatu radikal bebas. Pengukuran IC<sub>50</sub> dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*, dimana nilai IC<sub>50</sub> menunjukkan besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat radikal bebas sebanyak 50% (Harnita, 2007)

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

Dimana  $A_{\text{control}}$  merupakan besar absorbansi tanpa sampel dan  $A_{\text{sampel}}$  merupakan besar absorbansi sampel dengan konsentrasi tertentu

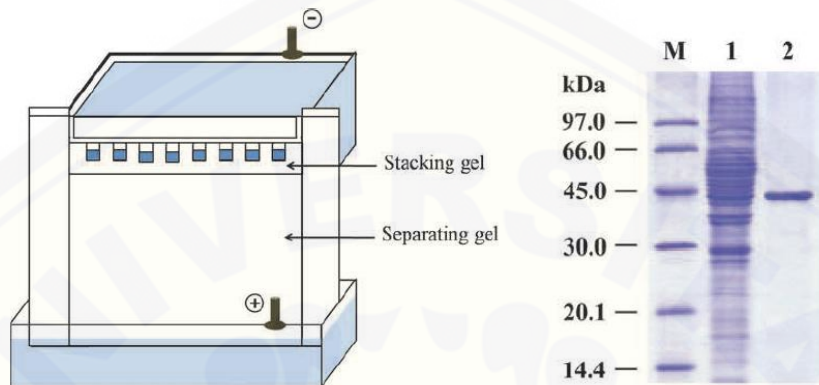
## 2.9 Elektroforesis

Elektroforesis gel *polyacrylamide* merupakan metode paling umum untuk memisahkan protein berdasarkan migrasi berat molekulnya dengan menggunakan *discontinuous polyacrylamide* gel sebagai medium penyangga dan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) untuk mendenaturasi protein. Metode ini disebut *Sodium Dodecyl Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE).

*Sodium dodecyl sulphate* (SDS) adalah deterjen anionik yang memiliki muatan negatif dalam range pH yang luas. Suatu rantai polipeptida dapat berikatan dengan SDS sesuai dengan ukuran molekul (*molecular mass*). Protein yang terdenaturasi sempurna akan mengikat SDS dalam jumlah yang setara dengan berat molekul protein tersebut (Dunn, 1989). Denaturasi protein dilakukan dengan merebus sampel dalam buffer yang mengandung *β-mercaptoethanol* (berfungsi untuk mereduksi ikatan *disulphide*), gliserol, dan SDS (Wilson dan Walker, 2000). Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negative dari anion yang terikat kompleks protein-SDS memiliki ratio muatan per berat molekul yang konstan (Hames, 1987) Muatan negatif SDS akan menghancurkan sebagian besar struktur kompleks protein dan akan tertarik kearah anoda (*positively-charged electrode*) bila ditempatkan dalam suatu medan elektrik.

Pewarna *Commassie Brilliant Blue* yang dapat terionisasi memberikan warna pada sampel protein yang diinjeksi dalam sumur gel, yang terlihat seperti pita-pita. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan  $R_f$  protein dengan standar yang berat molekulnya telah diketahui (Wilson dan Walker, 2000). Arah elektroforesis dari atas ke bawah, dimana protein dengan berat molekul kecil

bergerak cepat dalam gel, sedangkan protein dengan berat molekul besar tinggal di atas, berdekatan dengan titik aplikasi campuran (Stryer, 2000).



Gambar 2.13 Elektroforesis gel poliakrilamida (Sattayasai, 2012)

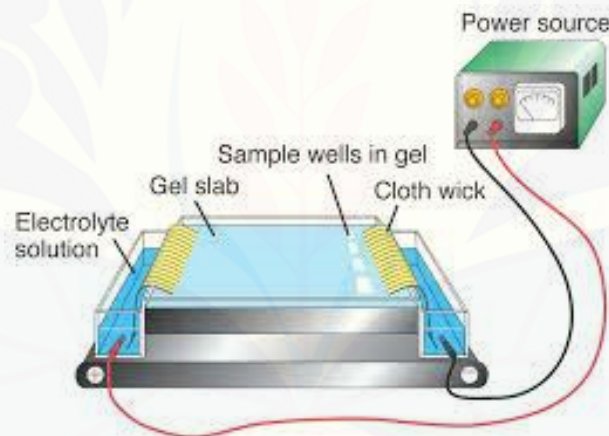
Elektroforesis merupakan teknik untuk memisahkan sampel berdasarkan atas ukuran (berat molekul) dan struktur fisik molekulnya. Prinsip dasar elektroforesis adalah proses migrasi molekul bermuatan di dalam suatu media bermuatan listrik, kecepatan migrasinya tergantung kepada muatan, ukuran dan bentuk setiap molekul yang terlibat, dimana molekul yang berukuran lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat dibandingkan dengan molekul berukuran besar. Elektroforesis secara umum digunakan untuk analisis kualitatif protein dan DNA (Khairul, 2009).

Elektroforesis gel *agarose* adalah metode pemisahan molekul DNA yang didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga matriks stabil di bawah pengaruh medan listrik dalam media gel *agarose*. Elektroforesis gel *agarose* digunakan untuk memisahkan fragmen DNA dan menentukan urutan DNA (*sequencing*) yang berukuran lebih besar dari 100 pb dan dijalankan secara horizontal. Lokasi fragmen DNA yang terbentuk seperti pita-pita pada elektroforesis dapat diamati secara spesifik dengan menggunakan pewarna. Pewarna yang digunakan adalah *etidium bromide* yang dapat menyisip di antara basa-basa pada DNA.

Menurut Susanto (2102), laju migrasi DNA ditentukan oleh konformasi molekulnya, dari yang paling cepat yaitu *Super Coiled/Covalently Closed Circular*

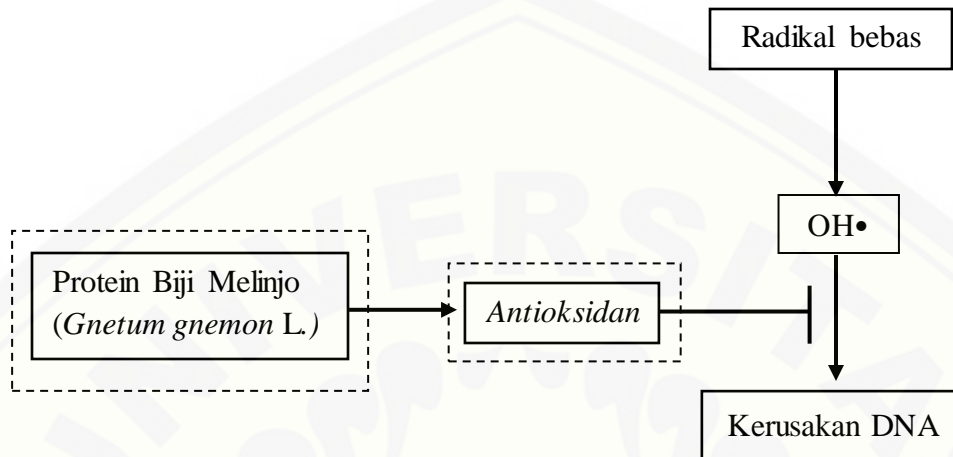
(CCC), *Open Circular* (OC), dan *linier*. Plasmid DNA dengan restriksi enzim mengurangi pembentukan bagian linear serta memperjelas formasi bagian *supercoiled* dan *open circular*. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya.

Proteksi terhadap kerusakan DNA dianalisis melalui elektroforesis gel *agarose* 1%. Proteksi terhadap kerusakan DNA dianalisis dengan pencegahan perubahan morfologi SC (*super coiled*) plasmid DNA menjadi OC (*open circular*) plasmid DNA yang diinisiasi ROS dari reagen fenton (Siswoyo *et al.*, 2010).



Gambar 2.14 Skema Elektroforesis Gel *Agarose* (SCL, 2009)

## 2.10 Kerangka Konseptual



Gambar 2.15 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan:

- : Permasalahan
- : Variabel yang diteliti
- | : Supresi

Penelitian ini berfokus kepada radikal hidroksil (OH•) karena diketahui bahwa radikal hidroksil merupakan spesies oksigen reaktif paling poten dan menjadi inisiator reaksi berantai dalam DNA yang menyebabkan pemutusan ikatan hidrogen pada DNA sehingga menyebabkan kerusakan DNA.

## 2.11 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan beberapa teori dan tinjauan pustaka, hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah:

Protein terhidrolisis biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) memiliki kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA.

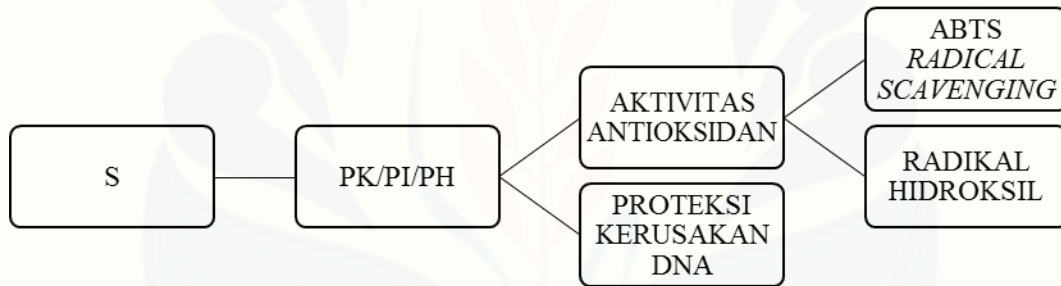
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian ekperimental yang bertujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Jenis penelitian eksperimental yang digunakan adalah *True Experimental Laboratories* (Notoadmojo, 2005).

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut.



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Sampel biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- PK : Protein kasar biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- PI : Protein isolat biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- PH : Protein hidrolisis biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- ABTS : Pengujian aktivitas peredaman radikal ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))



### 3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang sudah masak secara fisiologis, ditandai dengan warna kulit luar merah tua. Biji melinjo tersebut diperoleh petani di daerah Jember, Jawa Timur.

### 3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini seluruhnya dilakukan di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Waktu Penelitian pada bulan Desember 2014 – Februari 2015.

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator (Carbolite), *microplate reader* (spektrofotometer Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), sentrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), *gel electrophoresis*, *Gel Doc* UV transluminator, *dry block heater*, *microplate*, tabung reaksi, *siringe* Hamilton dan alat pendukung penelitian lainnya

#### 3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Biji Melinjo, aquadest, Buffer fosfat, HCl, NaOH, TNBS (*trinitro-benzene-sulfonic acid*), reagen Bradford, EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acid*), FeCl<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *deoxyribose*, Asam Ascorbat, TBA (*Tiobarbituric acid*), TCA (*Trichloroacetic acid*), *alcalase*, plasmid DNA *pBluescript*, media cair Luna Bertani, antibiotik *amphicillin*, ddH<sub>2</sub>O, *agarose gel*, ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*), potassium per sulfate, fosfat buffer salin, Kit Gene All SV *Coloum type T*, dan bahan pendukung lainnya.

### 3.6 Variabel Penelitian

#### 3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi sampel uji (protein kasar (Gg-PK), protein isolat (Gg-PI), dan protein terhidrolisis (Gg-PH) biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)).

#### 3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil persen (%) peredaman radikal bebas, serta pita SC (*supercoiled*) dan OC (*opencircular*) pada elektroforesis gel *agarose* 1% terhadap sampel uji.

#### 3.6.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah waktu inkubasi, suhu dan waktu sterilisasi, cara transluminasi gel, cara ekstraksi sampel, dan prosedur kerja penelitian

### 3.7 Definisi Operasional

1. Sampel biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) adalah sampel yang sudah masak secara fisiologis, ditandai dengan warna kulit luar merah tua.
2. Protein kasar (Gg-PK) adalah ekstrak protein kasar yang diperoleh dari biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang telah dihaluskan yang kemudian dipisahkan antara pelet dan supernatan. Pengujian ini menggunakan protein kasar dari supernatan.
3. Protein isolat (Gg-PI) adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang kemudian dilakukan pengisolasian protein dengan metode *isoelectric precipitation* (pembuatan ekstrak biji melinjo dan isolasi protein dapat dilihat di 3.8.1 dan 3.8.2).
4. Protein terhidrolisis (Gg-PH) adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang dihaluskan dan dilarutkan dengan aquadest (perbandingan 1:3), yang kemudian melalui proses pencernaan oleh *alcalase*

dan dilakukan pengisolasian protein. Tujuan dari proses ini adalah untuk menghasilkan protein dengan berat molekul yang lebih kecil.

5. Uji peredaman radikal hidroksil adalah uji peredaman radikal bebas yang menggunakan reagen Fenton sebagai penghasil radikal hidroksil dan gula deoksiribosa sebagai model makromolekul yang didegradasi. Penghitungan besar absorbansi dari hasil reaksi menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  532 nm.
6. Uji peredaman radikal ABTS adalah uji peredaman radikal dengan menggunakan senyawa *2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)* sebagai sumber penghasil radikal bebas. Metode ini menggunakan prinsip inhibisi, yaitu sampel ditambahkan pada sistem penghasil radikal bebas dan pengaruh inhibisi terhadap efek radikal bebas diukur untuk menentukan total kapasitas antioksidan dari sampel. Penghitungan besar absorbansi dari hasil reaksi menggunakan spektrofotometer pada  $\lambda$  732 nm.
7. Elektroforesis gel *agarose* 1% adalah metode pemisahan molekul DNA yang didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga matriks stabil di bawah pengaruh medan listrik dalam media gel *agarose*. Kerusakan DNA diindikasikan dengan konversi SC (*super coiled*) plasmid DNA menjadi OC (*open circular*) plasmid DNA

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 Ekstraksi Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Bahan baku yang digunakan adalah 25 gram biji melinjo masak secara fisiologis ditandai dengan kulit luar berwarna merah penuh. Kulit biji melinjo dibuang dan biji dihilangkan lapisan kedua secara manual. Biji lapisan ketiga digerus menjadi serbuk dengan menggunakan mortar dan pasir kuarsa untuk mempermudah pengestrakan kemudian disaring menggunakan penyaring dan dilarutkan dalam 75 ml aquadest (perbandingan 1:3). Selanjutnya, larutan tersebut dimasukkan ke dalam tube dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15

°C. Supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar biji melinjo (Gg-PK).

### 3.8.2 Isolasi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Pengisolasian protein menggunakan metode *isoelektric precipitation*. Supernatan hasil sentrifugasi dari proses ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) diatur diatur pHnya menjadi 4 dengan menambahkan 1 M HCl. Pada pH ini sebagian besar protein akan mengendap di titik isoelektriknya. Kemudian suspensi dibiarkan selama 30 menit untuk memungkinkan protein dapat terendapkan secara sempurna. Larutan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 15°C untuk memisahkan protein berupa endapan dan cairan sisa yang mengandung bahan-bahan terlarut seperti gula, mineral, dan sebagainya. Endapan protein dilarutkan dengan air distilat dan diatur pHnya sampai 8 dengan menggunakan 1 N NaOH. Hasil dari isolasi protein ini disebut sebagai protein isolat biji melinjo (Gg-PI).

### 3.8.3 Ekstraksi Protein Terhidrolisis Biji Melinjo

Pengkondisian protein terhidrolisis biji melinjo dilakukan setelah menjalani proses ekstraksi dan pengujian kadar protein Bradford. Protein isolat biji melinjo ditambahkan *alcalase* 20µl 10 kali pengenceran. Setelah itu di inkubasi 50°C selama 10 jam. Kemudian dipanaskan kembali selama 10 menit pada suhu 95°C. Setelah itu hasilnya disentrifuse 10000 rpm selama 10 menit dalam suhu 15°C. Bagian supernatan yang kemudian akan dianalisis sebagai protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH)

### 3.8.4 Penentuan Total Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan metode Bradford (1970) dalam Deutcher (1990). Sampel sebanyak (5 µl) ditambahkan dengan 45 µl aquadest dan ditambah dengan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorban diukur pada panjang gelombang

$\lambda$  595 nm. Hasil yang didapat dibandingkan dengan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) untuk mengetahui kandungan protein terlarut.

### 3.8.5 Pengukuran Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan TNBS (*trinitro-benzene-sulfonic acid*) (Adler-Nissen, 1979). Sampel 0,25 mL dicampur dengan 2 mL 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 2 mL 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada 50°C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 4 mL 0,1M HCl, dan dibaca absorbansinya pada  $\lambda$  420 nm. Larutan 1,5 mM L-leucine digunakan sebagai standart. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan :  $DH = h/h_{tot} \times 100\%$ ; dimana h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan  $h_{tot}$  adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

### 3.8.6 Uji Peredaman Radikal ABTS

Uji peredaman radikal ABTS sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh You *et al* (2002). Reagen ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*) dipersiapkan dengan mencampurkan 7 mM ABTS dan 2,45 mM *potassium per sulfate* dengan jumlah sebanding yang kemudian diinkubasikan selama 12-16 jam di tempat gelap pada suhu ruang. Sebelum memulai pengujian, reagen ABTS dilarutkan dengan 0,2 M PBS (*phosphate buffer saline*) pH 7,4 hingga besar absorbansi  $0,70 \pm 0,02$  pada  $\lambda$  734 nm. Sampel untuk uji peredaman ABTS radikal dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu 2  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 6  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , dan 10  $\mu\text{g/mL}$ . Untuk kontrol blanko dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan sampel. Campuran sampel dan reagen ABTS dihomogenisasi dengan vortex selama 30 detik dan diinkubasi pada ruang gelap selama 6 menit. Uji peredaman ABTS radikal dinyatakan sebagai persen (%) penghambatan terhadap radikal ABTS. Persen penghitungan dihitung sesuai rumus

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

Dimana  $A_{\text{control}}$  merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (standar) dan  $A_{\text{sampel}}$  adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran  $IC_{50}$  dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*.

### 3.8.7 Pengujian Peredaman Radikal Hidroksil (*Hydroxyl Radical Scavenging Activity*)

Pengujian peredaman radikal hidroksil (*Hydroxyl radical scavenging activity*) sesuai dengan metode Halliwell dan Gutteridge (1987) dalam Kumar *et al.*, 2013 dengan perubahan. Pada tabung reaksi tertutup, masukkan 36  $\mu\text{L}$  10 mM deoksiribosa dan 100  $\mu\text{L}$  sampel protein dengan konsentrasi 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 2  $\mu\text{g/mL}$ , 4  $\mu\text{g/mL}$ , 6  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$ , dan 10  $\mu\text{g/mL}$ . kemudian pada masing-masing tabung tambahkan  $\text{FeCl}_3$  1  $\mu\text{L}$  10 mM, EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acid*) 10  $\mu\text{L}$  1 mM,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu\text{L}$  10 mM, buffer fosfat 33  $\mu\text{L}$  50 mM pH 7,4; dan asam 10  $\mu\text{L}$  0,1 mM sehingga total volume akhir 200  $\mu\text{L}$ . Inkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Tambahkan 25  $\mu\text{L}$  TCA (*trichloroasetic acid*) 10% dan 25  $\mu\text{L}$  TBA (*thiobarbituric acid*) untuk memunculkan warna kromogen pink. Tabung reaksi berisi sampel kemudian dipanaskan pada  $80^\circ\text{C}$  selama 30 menit. Kemudian didinginkan dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang  $\lambda$  532 nm. Untuk kontrol dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan sampel. Faktor koreksi dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan TBA. Aktivitas peredaman radikal hidroksil ( $\text{OH}\cdot$ ) dinyatakan sebagai persen (%) penghambatan terhadap radikal hidroksil dan  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ). Persen penghitungan dihitung sesuai rumus

$$\text{Persen Inhibisi} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{control}}} \times 100\%$$

Dimana  $A_{\text{control}}$  merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (standar) dan  $A_{\text{sampel}}$  adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran  $IC_{50}$  dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*.

### 3.8.8 Analisis Pola Pita Protein dengan Elektroforesis SDS-PAGE

Analisis pola pita protein menggunakan 15% SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) sesuai dengan metode Laemmli (1970). *Separating gel* 15% dituang ke dalam *plate* pembentuk gel sampai batas yang terdapat pada *plate*. Aquadest ditambahkan di atas larutan gel dalam *plate* agar permukaan gel tidak bergelombang. Setelah gel memadat, aquadest yang menutupi *separating gel* dibuang, kemudian *stacking gel* dituang diatas *separating gel*, *comb* dimasukkan untuk membuat sumuran sampel. *Plate* yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah gel terendam

Sampel buffer ditambahkan ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung *eppendorf* kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 3 menit.. Sampel dengan kandungan protein 40,7 µg dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan *syringe* Hamilton, kemudian *dirunning* pada arus konstan 20 mA 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 pada kecepatan 36 rpm selama 24 jam. Setelah itu, larutan staining dituang kembali pada wadahnya kemudian dicuci dengan aquadest. Gel direndam dalam larutan destaining dengan kecepatan 36 rpm selama 3 jam atau sampai pita protein terlihat jelas. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan antara pola protein sampel dengan marker protein yang telah diketahui berat molekulnya.

### 3.8.9 Kultur dan isolasi plasmid DNA

Plasmid DNA yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah plasmid DNA *pBluescript*. Dalam 2 ml media LB cair di tabung kultur tertutup yang telah disterilkan dengan autoclave, masukkan 2 µl ampicillin sebagai antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain dan 10 µl plasmid DNA *pBluescript*. Inkubasi 16-21 jam dalam shaking inkubator dalam suhu ruang. Kemudian plasmid DNA

diisolasi dengan kit Plasmid *Quick Method EzClear™ GeneAll* dan pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan *nanodrop Nano Vue*.

#### 3.8.10 Proteksi terhadap Kerusakan DNA melalui Elektroforesis Gel *Agarose* 1%

Elektroforesis gel *agarose* 1% untuk mengetahui efek proteksi ekstrak protein biji melinjo (*Gnetum genmon* L.) terhadap kerusakan DNA yang diinduksi hidroksil radikal dari reaksi fenton sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Arnao (2000). Pada tabung ependrop, masukkan 0,5 µg plasmid DNA *pBluescript* dengan campuran larutan 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50µM asam ascorbat, dan 80 µl FeCl<sub>3</sub>. Tambahkan 15 µg sampel ekstrak protein dan tambahkan *deionized* aquadest steril sampai volume akhir 20 µl. Kontrol (+) merupakan plasmid DNA murni tanpa tambahan reaksi fenton. Plasmid dan *fenton reaction* juga ditambahkan sebagai pembanding berdasarkan waktu 5 menit, 10 menit, dan 15 menit. Semua sampel kemudian diinkubasikan selama 30 menit pada 37°C. Preparasi sampel sebelum dirunningkan dalam sumur gel *agarose* 1% dilakukan dengan menambahkan loading buffer dengan perbandingan 1 : 4. Jumlah maksimal sampel yang dapat dimasukkan dalam setiap sumur gel adalah 10 µl. Gel *agarose* dengan pewarnaan etidium bromide dirunningkan dalam buffer TBE dengan tegangan 50V selama ± 60 menit sampai terbentuk pita. Setelah elektroforesis selesai, pengamatan pita dilakukan dengan transluminasi UV *Gel Doc* untuk mendeteksi bagian SC (*super coiled*)/ CCC (*covalenty closed circular*) plasmid DNA, OC (*open circular*) plasmid DNA, dan *Linear* plasmid DNA.

### 3.9 Analisis Data

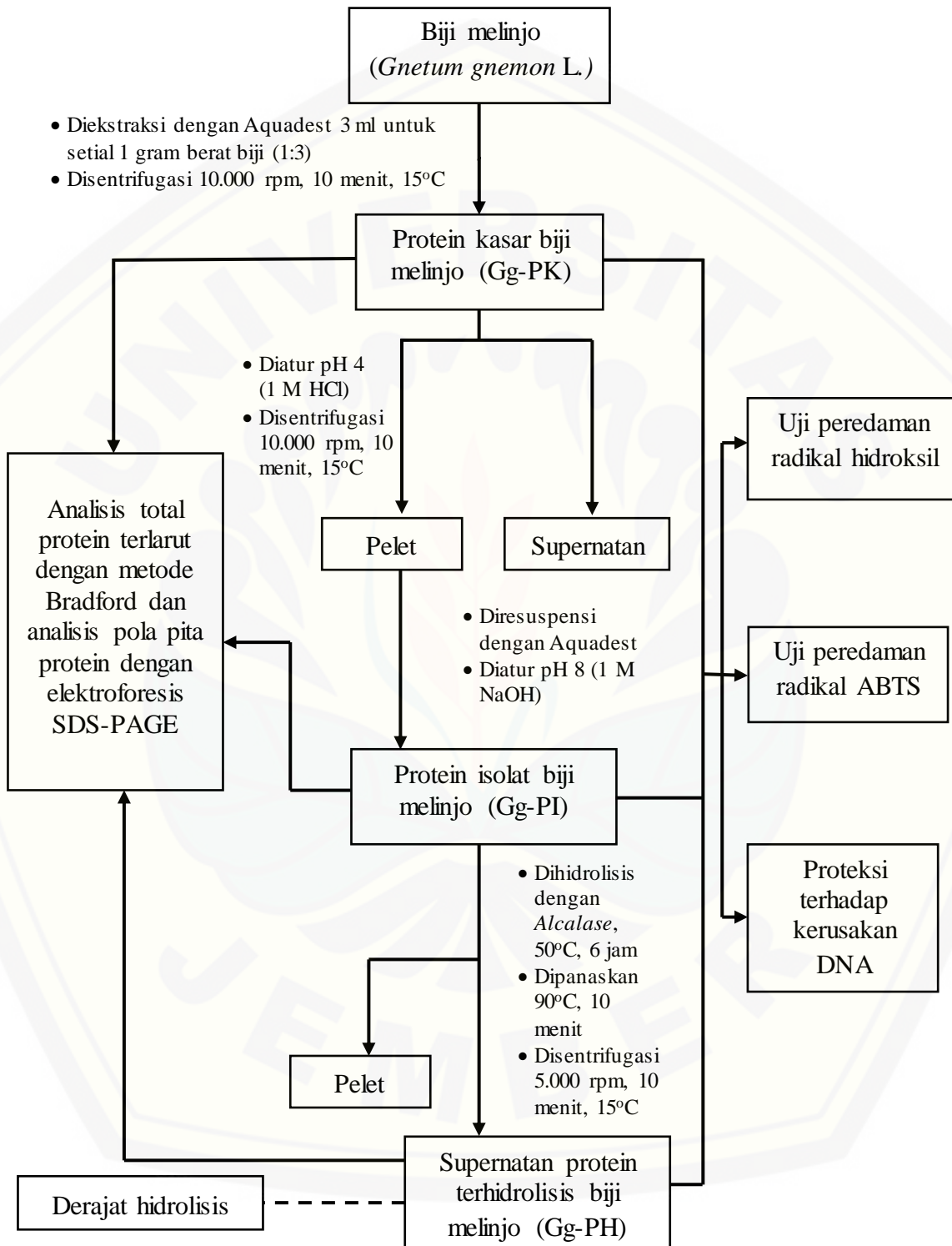
Analisis data regresi linear menggunakan Microsoft Excel 2013 untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub> dari masing-masing tahapan pemurnian protein. Analisis statistik menggunakan uji normalitas dengan  $p > 0,05$  selanjutnya dilakukan uji korelasi sederhana bivariat untuk mengetahui hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat. Setelah itu dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah



sampel yang diambil variannya sama. Jika populasi terdistribusi normal dan homogen dilakukan uji statistik *one way* ANOVA untuk membandingkan antar perlakuan.



### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Ekstraksi Protein Kasar Biji Melinjo (Gg-PK)

Biji melinjo diperoleh dari tanaman melinjo yang berada di Jember. Bahan yang digunakan adalah 25 gram biji melinjo masak secara fisiologi, yang ditandai dengan kulit luar berwarna merah. Setelah dicuci dan dikupas kulit terluarnya, lapisan kulit keduanya dikupas secara manual. Lapisan biji melinjo ketiga digerus dengan mortir hingga menjadi serbuk, kemudian disaring dengan menggunakan penyaring berukuran 100 mesh dan dilarutkan dalam 75 ml aquades (dengan perbandingan 1:3). Selanjutnya, larutan tersebut disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15<sup>0</sup> C. Hasil sentrifus ini dipisahkan antara pelet dan supernatannya, supernatan ini yang selanjutnya disebut sebagai protein kasar (Gg-PK). Protein kasar yang diperoleh sebanyak 62 mL dan total protein 592,2 mg.

### 4.2 Isolasi Protein Biji Melinjo (Gg-PI)

Isolasi protein pada biji melinjo dilakukan dengan metode *isoelectric precipitation*. Metode *isoelectric precipitation* merupakan pengendapan protein berdasarkan titik isoelektriknya, kelarutan protein menjadi minimal ketika mendekati titik isoelektriknya (pH 4) akibat peningkatan interaksi elektrostatis antar molekul protein sehingga interaksi elektrostatis dengan air menjadi minimal. Supernatan hasil sentrifugasi dari proses ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) diatur pHnya menjadi 8 dengan menambahkan 1 N NaOH. Setelah itu dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15°C untuk mengendapkan bahan yang tidak larut berupa ampas dan kotoran lainnya. Selanjutnya supernatan di atur pHnya menjadi 4 dengan menambahkan 1 N HCl. Pada pH ini sebagian besar protein akan mengendap dititik isoelektriknya. Endapan protein dilarutkan dengan air distilat dan diatur pHnya sampai 8 dengan menggunakan 1 N NaOH. Proses ini menghasil proten isolat biji melinjo (Gg-PI). Dalam proses tersebut

menghasilkan Gg-PI sebanyak 21 mL dengan total protein 243,6 mg. Hasil produksi bertahap Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil Produksi Bertahap Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Sampel Uji	Volume (mL)	Konsentrasi (mg/mL)	Total Protein (mg)	Recovery (%)*
Gg-PK	63	9,36 ± 0,16	592,2	100
Gg-PI	21	11,55 ± 0,18	243,6	41,13
Gg-PH	11	4,07 ± 0,10	45,1	7,61

\*) % Recovery menunjukkan persentase protein yang didapat dalam proses ekstraksi

#### 4.3 Hidrolisis Protein Biji Melinjo (Gg-PH) dan Penentuan Derajat Hidrolisis (DH)

Hidrolisis enzimatik merupakan bagian terpenting dalam proses modifikasi struktur protein tanpa mempengaruhi nutrisi yang terkandung didalamnya. Hidrolisis enzimatik protein bertujuan untuk memotong ikatan peptida kompleks sehingga menurunkan berat molekulnya dan meningkatkan kemampuan fungsional protein seperti meningkatkan derajat kelarutan titik isoelektrik dan lebih stabil terhadap pemanasan (Zhidong *et al.*, 2013). Proses hidrolisis protein mempengaruhi struktur permukaan protein yang berdampak terhadap interaksi protein dengan air dan interaksi dengan protein lain sehingga memiliki sedikit struktur sekunder yang berikatan dengan protein (Pace *et al.*, 2004).

Produksi protein terhidrolisis (Gg-PH) dilakukan dengan menghidrolisis protein isolat (Gg-PI) dengan menggunakan *alcalase* dengan perbandingan 0,2 % (E/S) pada kondisi suhu 50°C pada pH 8 selama 7-8 jam (Siswoyo *et al.*, 2012). Penggunaan *alcalase* dalam proses hidrolisis protein karena *alcalase* mempunyai derajat hidrolisis terbesar dan spektrum pemotongan ikatan peptida yang lebih luas dibandingkan dengan enzim proteolitik lainnya (Oh *et al.*, 2013; Muhamyankaka, *et al.*, 2013). Pengkondisian protein terhidrolisis biji melinjo dilakukan setelah menjalani proses ekstraksi kasar, isolasi protein, dan pengujian kadar protein

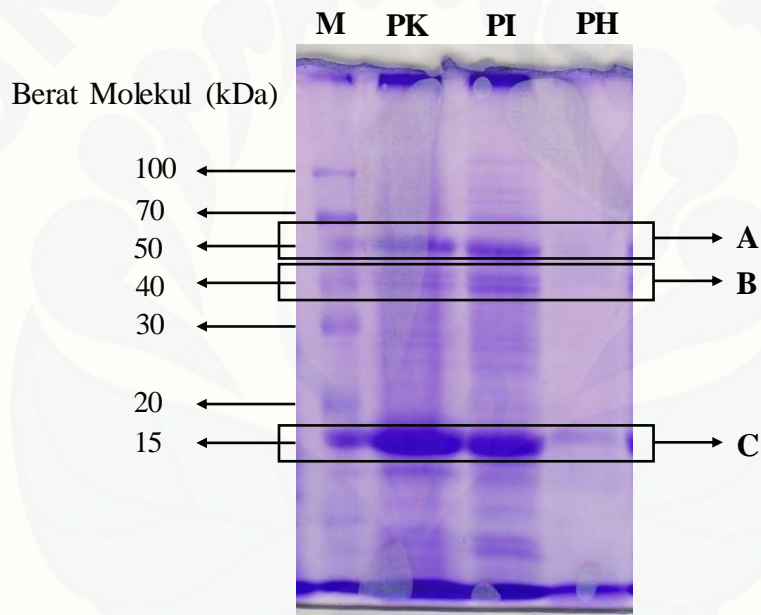
Bradford. Gg-PI sebanyak 11 mL (total protein 127,6 mg) digunakan sebagai bahan hidrolisis enzimatis dengan menambahkan *alcalase* sebanyak 255,2  $\mu$ L yang sudah diencerkan 10x dari stok *Alcalase* 24 FLG menggunakan buffer fosfat 0,2M pH 7,4. Proses hidrolisis Gg-PI oleh *alcalase* menghasilkan produk berupa campuran peptida dan asam-asam amino (Gg-PH) melalui pemecahan ikatan peptida. Inaktivasi enzim dilakukan melalui inkubasi hidrolisat pada suhu 95°C selama 10 jam. Selanjutnya protein terhidrolisis yang terbentuk dipisahkan antara pelet dan supernatan secara sederhana dengan sentrifugasi. Supernatan ini yang selanjutnya disebut dengan protein terhidrolisis (Gg-PH). Protein terhidrolisis yang diperoleh dalam proses ini sebanyak 11 mL dan total protein 45,1 mg.

Derajat hidrolisis digunakan untuk memonitoring reaksi hidrolisis dalam memotong ikatan peptida. Metode TNBS dipergunakan dalam penentuan derajat hidrolisis, dimana reaksi primer asam amino dengan reagen TNBS membentuk kromofor yang kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang  $\lambda$  420 nm. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan mengetahui total asam amino dari sampel awal Gg-PI dan total asam amino dari sampel terhidrolisis Gg-PH. Hasil perhitungan derajat hidrolisis (DH) *Alcalase* dalam menghidrolisis Gg-PI sebesar 55,45 % tingginya derajat hidrolisis menunjukkan bahwa peptida atau asam amino yang terbentuk semakin banyak sehingga menghasilkan protein hidrolisat dengan berat molekul lebih kecil.

#### 4.4 Pola Pita Protein pada Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis adalah suatu proses migrasi atau perpindahan molekul bermuatan di dalam suatu media bermuatan listrik, dimana kecepatan migrasinya bergantung kepada muatan, ukuran, dan bentuk setiap molekul yang terlibat. Pada saat arus listrik diberikan, molekul bermigrasi melalui media gel, molekul yang lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat, sehingga terjadi pemisahan (Dunn, 1989). Metode paling umum untuk memisahkan protein adalah dengan cara elektroforesis menggunakan *discontinuous polyacrylamide gel* sebagai medium penyangga dan

*Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) untuk mendenaturasi protein. Fungsi dari elektroforesis adalah untuk mengetahui pola protein yang terdapat pada biji melinjo dan mengetahui berat molekul dari protein yang terkandung didalamnya. Proses hidrolisis protein bertujuan untuk menurunkan berat molekul protein melalui pemotongan ikatan peptida, hal ini dapat dilihat dari profil proteinnya pada jumlah protein yang sama, yaitu sebesar 40,7  $\mu\text{g}$ . Hasil SDS PAGE serta perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE pada protein biji melinjo Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH dapat dilihat pada gambar 4.1 dan table 4.2.



Gambar 4.1 Elektroforesis SDS-PAGE. M = Marker Protein; PK = Protein Kasar (Gg-PK); PI = Protein Isolat (Gg-PI); PH = Protein Terhidrolisis (Gg-PH)

Tabel 4.2 Perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE dari sampel protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Protein	Rf	PK	PI	PH
A	0,33	++	++	-
B	0,41	+	+	-
C	0,71	+++	+++	+

Keterangan : Rf = *Retardation factor*  
 (-) Tidak ada pita  
 (+) Ada pita (tidak jelas)  
 (++) Ada pita (jelas)  
 (+++) Ada pita (sangat jelas)

Pada gambar 4.1 diatas hasil elektroforesis pada protein biji melinjo Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH. Pada Gg-PK dan Gg-PI mempunyai tiga pita protein dengan perkiraan berat sebesar 50 kDa dan 40 kDa, serta berat 15 kDa yang mendominasi pada kedua tahapan pemurnian protein. Sementara pada protein terhidrolisis (Gg-PH) hanya didapatkan pita protein dengan berat molekul 15 kDa seperti perbandingan hasil elektroforesis SDS-PAGE yang tampak pada tabel 4.2. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya, bahwa protein yang mendominasi pada perkiraan berat 15 kDa (Siswoyo *et al.*, 2014). Kesamaan profil pita protein pada Gg-PK dan Gg-PI menunjukkan bahwa Gg-PI tidak mengalami modifikasi struktur protein melainkan hanya peningkatan konsentrasi protein yang didapat melalui metode *isoelectric precipitation*. Profil pita Protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) didominasi oleh berat molekul 15 kDa dan tidak terdapat pita protein dengan berat 50 kDa dan 40 kDa, seperti yang tampak pada gambar 4.1 dan tabel 4.2. Protein 50 kDa dan 40 kDa yang menghilang menunjukkan bahwa terdapat modifikasi struktur protein setelah adanya proses pencernaan oleh enzim *alcalase*, ditandai dengan perubahan berat molekul protein menjadi lebih kecil sebesar 15 kDa atau lebih kecil. Hidrolisis enzimatik bekerja dengan memotong protein tanpa merusak kandungan asam amino didalamnya. Hidrolisis enzimatik meningkatkan asam amino bebas yang ditunjukkan dengan modifikasi struktur protein dengan berat molekul yang lebih kecil (Carthy *et al.*, 2013). Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa

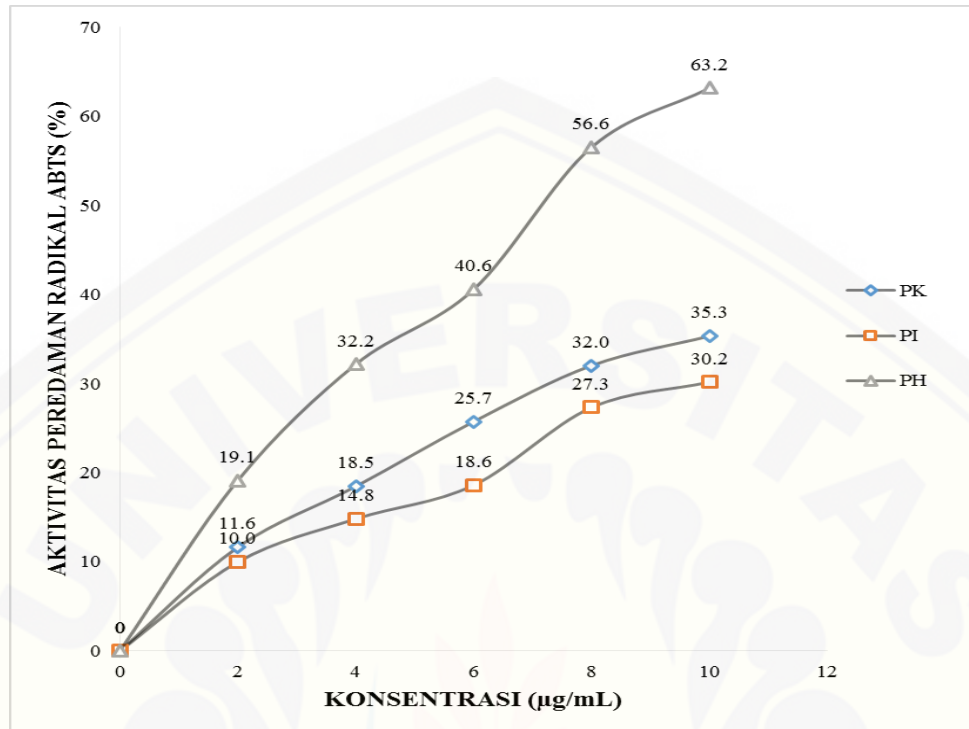
perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan  $\text{NH}_3^+$  dan  $\text{COO}^-$  dan berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida serta rusaknya struktur globular protein (Pace *et al*, 2004)

#### 4.5 Aktivitas Protein Antioksidan pada Peredaman Radikal ABTS

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat kerusakan sel melalui penghambatan reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dengan menghambat terjadinya reaksi pembentukan reaksi radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Waji dan Sugrani, 2009). Pengujian aktivitas protein antioksidan pada biji melinjo digunakan untuk mengetahui tahapan pemurnian protein dengan aktivitas peredaman radikal bebas paling tinggi.

ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*) merupakan senyawa radikal larut air dan stabil secara kimia (Arnao, 2000). Akumulasi dari ABTS dapat dihambat oleh antioksidan pada medium reaksi dengan aktifitas yang bergantung waktu reaksi dan jumlah antioksidan. Kemampuan antioksidan untuk mereduksi ABTS diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang  $\lambda$  734 nm. Absorbansi maksimal juga dapat terjadi pada panjang gelombang yang lain. Panjang gelombang yang mendekati infra merah  $\lambda$  734 nm dipilih untuk meminimalkan intervensi dari absorbansi komponen lain. Radikal ABTS ini digunakan untuk *general screening* potensi antioksidan protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)





Gambar 4.2 Aktivitas Peredaman Radikal ABTS Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) pada Berbagai Sampel Protein

Analisis data menggunakan software IBM SPSS 21. Dari uji korelasi bivariat sederhana untuk mengetahui apakah ada hubungan antara variabel bebas (konsentrasi sampel uji) dengan variabel terikat (% penghambatan radikal bebas). Dari uji korelasi bivariate sederhana (lampiran F) didapatkan nilai  $p=0,000$  dan nilai  $\alpha=0,05$  pada kedua data serta koefisien korelasi  $r=0,832$ . Nilai  $p<\alpha$  ( $p<0,05$ ) menunjukkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara variabel bebas dan variabel terikat. Besar korelasi  $r=0,832$  berada pada rentang 0,75-0,99, hal ini menunjukkan bahwa arah korelasi bersifat positif dan keeratan hubungan yang sangat kuat. Artinya semakin tinggi konsentrasi sampel uji yang diberikan maka aktivitas peredaman radikal bebas cenderung semakin besar pula.

Selanjutnya, data diuji menggunakan uji *One Way* ANOVA (lampiran F). Uji *One Way* ANOVA dilakukan untuk menguji data apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara signifikan (nyata) atau tidak. Hasil uji menunjukkan angka

signifikansi sebesar 0,006 ( $p < 0,05$ ), ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh dari pemberian sampel uji protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) secara bermakna (signifikan) terhadap aktivitas peredaman radikal ABTS.

Persentase aktivitas peredaman radikal ABTS pada protein biji melinjo dengan konsentrasi 0-10  $\mu\text{g/mL}$  protein seperti grafik diatas menunjukkan bahwa protein kasar (Gg-PK) pada konsentrasi protein 10  $\mu\text{g/mL}$  protein memiliki aktivitas peredaman mencapai  $35,34 \pm 0,62$  %, protein isolat (Gg-PI) dengan konsentrasi yang sama mencapai  $30,18 \pm 0,19$  %, dan protein terhidrolisis (Gg-PH) mempunyai nilai aktivitas antioksidan tertinggi yaitu mencapai  $63,19 \pm 0,14$  %. Aktivitas peredaman terhadap radikal ABTS mengindikasikan kemampuan protein untuk mendonorkan elektron ataupun atom hidrogen sehingga memutus reaksi berantai dari radikal bebas, menjadikan senyawa yang lebih stabil dan menurunkan nilai absorbansi (Shimada *et al.*, 1992).

Tabel 4.3 Nilai  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) Protein Biji Melinjo pada Berbagai Sampel Uji

SAMPEL UJI	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Gg-PK	$28 \pm 1,0$
Gg-PI	$54 \pm 0,5$
Gg-PH	$6,9 \pm 0,03$

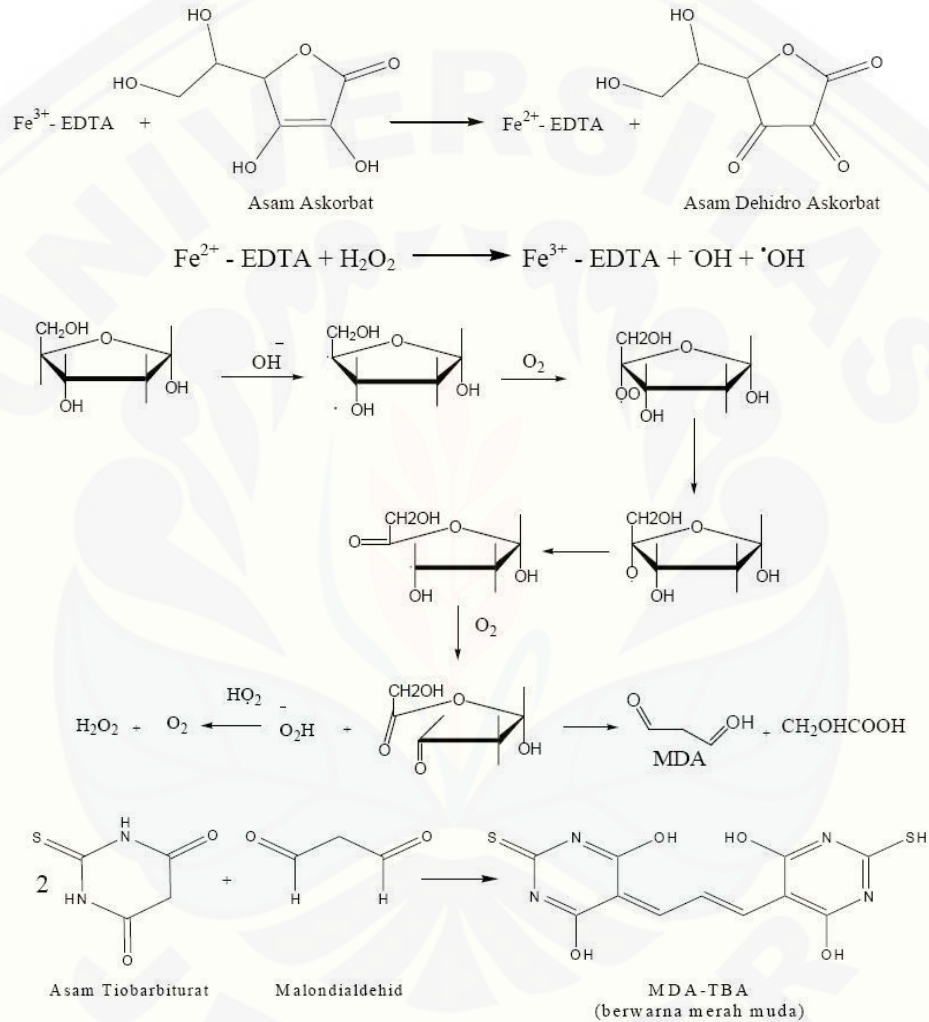
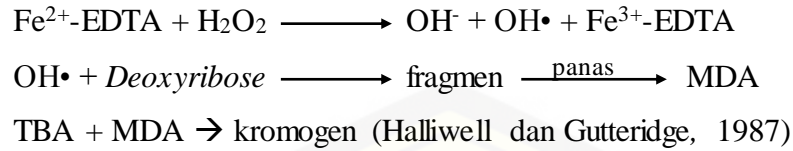
Tabel 4.3 menunjukkan bahwa terjadi perbedaan nilai  $\text{IC}_{50}$  atau konsentrasi protein antioksidan biji melinjo yang mampu meredam 50% radikal ABTS dari masing-masing tahapan pemurnian protein. Dari hasil pengujian ABTS nilai  $\text{IC}_{50}$  pada sampel protein kasar (Gg-PK) diperoleh sebesar  $28 \pm 1.0$   $\mu\text{g/mL}$ , protein isolat (Gg-PI) diperoleh sebesar  $54 \pm 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ , dan protein terhidrolisis (Gg-PH) diperoleh sebesar  $6,9 \pm 0,03$   $\mu\text{g/mL}$ . Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) mempunyai tingkat peredaman radikal bebas paling efektif dibandingkan dengan tahapan pemurnian protein lainnya, karena pada konsentrasi  $6,9 \pm 0,03$   $\mu\text{g/mL}$  tingkat peredaman radikal ABTS mencapai 50%. Protein terhidrolisis

menggunakan hidrolisis enzimatis dapat memodifikasi distribusi berat molekul protein serta strukturnya menjadi lebih sederhana serta meningkatkan distribusi asam amino bebas dengan potensi bioaktivitas, salah satunya potensi sebagai antioksidan. Ukuran peptida protein yang lebih kecil dan sederhana kemungkinan meningkatkan ikatan antara peptida-radikal bebas sehingga aktivitas antioksidannya juga meningkat (Elias *et al.*, 2008).

#### 4.6 Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil

Radikal hidroksil merupakan hasil samping dari respirasi aerob yang sangat reaktif diantara spesies oksigen reaktif dan menyebabkan kerusakan berat pada biomolekul (Gutteridge, 1984 dalam Halliwell *et al.*, 1987; Kunchandy dan Rao, 1989). Aktivitas kimia dari radikal hidroksil sangat kuat dan cepat bereaksi dengan biomolekul seperti asam amino, protein dan DNA (Jae *et al.*, 2007). Radikal hidroksil mempunyai sifat paling elektrofilik diantara reaktif oksigen spesies lainnya yang mampu berikatan dengan atom H pada DNA dan memotong ikatan rangkap DNA sehingga terjadi penguraian DNA (kerusakan DNA) (Lu *et al.*, 2010). Radikal hidroksil memiliki reaktivitas tinggi, secara tidak selektif juga mampu berikatan dengan gugus pentosa pada rantai DNA, melakukan penetrasi dan bereaksi dengan gugus basa. Kemampuan radikal hidroksil dalam bereaksi terhadap senyawa lain ditentukan sifat elektrofilik, reaksi termokinetik yang tinggi, dan mekanisme terbentukannya radikal hidroksil di sekitar DNA (Pryor, 1988).

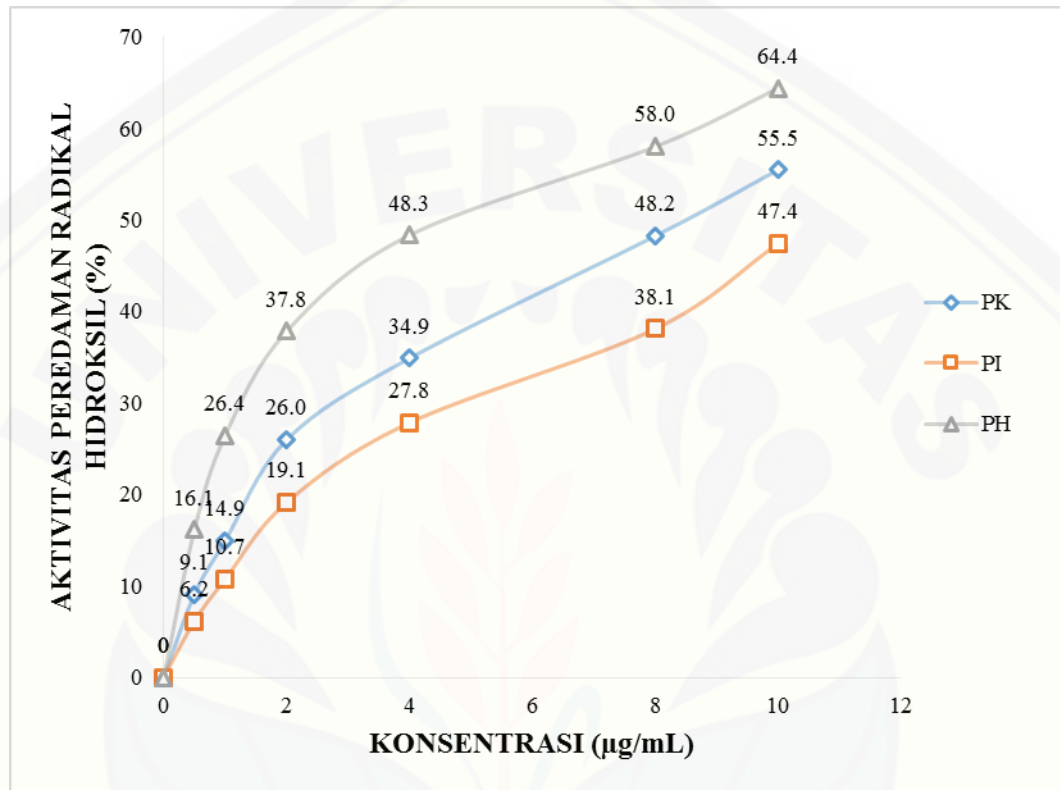
Pada penelitian ini, aktivitas peredaman radikal hidroksil diuji menggunakan metode deoksiribosa. Pada metode ini, radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi antara kompleks Besi-EDTA dengan  $H_2O_2$  dengan keberadaan asam askorbat (reaksi fenton). Radikal hidroksil menyerang deoksiribosa membentuk produk (fragmen-fragmen), kemudian campuran reaksi dipanaskan dalam kondisi asam. Ketika malondealdehid (MDA) dibentuk dapat dideteksi melalui kemampuannya bereaksi dengan TBA (*tiobarbituric acid*) yang dapat membentuk kromagen berwarna merah. Reaksi yang terjadi dapat dijelaskan sebagai berikut:



**Gambar 4.3** Reaksi Pembentukan Radikal Hidroksil melalui reaksi fenton.

Dalam pengujian aktivitas peredaman radikal hidroksil, antioksidan akan berkompetisi dengan deoksiribosa untuk berikatan dengan radikal hidroksil dan mengurangi pembentukan kromogen. Hubungan antara konsentrasi sampel dan aktivitas peredaman (*scavenging*) radikal hidroksil (% peredaman) disajikan pada

gambar 4.4. Peningkatan konsentrasi sampel dapat meningkatkan aktivitas peredaman radikal hidroksil. Selain itu, aktivitas peredaman radikal hidroksil juga dinyatakan sebagai nilai  $IC_{50}$  seperti pada table 4.3.



Gambar 4.4 Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil (OH) (%) Protein Biji Melinjo pada Berbagai Sampel Uji

Analisis data software IBM SPSS 21. Dari uji korelasi bivariat sederhana didapatkan nilai  $p = 0,000$  dan nilai  $\alpha = 0,05$  serta koefisien korelasi  $r = 0,896$ . Nilai  $p < \alpha$  ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa ada hubungan yang signifikan antara variabel bebas dan variabel terikat. Besar korelasi  $r=0,896$  berada pada rentang 0,75-0,99, hal ini menunjukkan bahwa arah korelasi bersifat positif dan keeratan hubungan yang sangat kuat. Artinya semakin tinggi konsentrasi sampel uji yang diberikan maka aktivitas peredaman radikal hidroksil cenderung semakin besar pula. Selanjutnya, data diuji menggunakan uji *One Way ANOVA* (lampiran F). Hasil uji signifikansi

sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ), hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh dari pemberian sampel uji protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) secara bermakna (signifikan) terhadap aktivitas peredaman radikal hidroksil.

Aktivitas antioksidan pada sampel protein biji melinjo dengan konsentrasi 0.5-10  $\mu\text{g/mL}$  protein terlarut seperti pada grafik diatas menunjukkan bahwa protein kasar (Gg-PK) pada konsentrasi protein 10  $\mu\text{g/mL}$  protein memiliki aktivitas peredaman mencapai  $55,47 \pm 0,67$  %, protein isolat (Gg-PI) dengan konsentrasi yang sama mencapai  $47,43 \pm 1,08$  %, dan protein terhidrolisis (Gg-PH) mempunyai nilai aktivitas antioksidan tertinggi yaitu mencapai  $64,39 \pm 0,70$  %. Dari grafik diatas dapat disimpulkan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) mempunyai kemampuan paling efektif dalam meredam radikal hidroksil. Presentase peredaman protein kasar (Gg-PK) lebih besar dari pada protein isolat (Gg-PI) dikarenakan pada protein kasar (Gg-PK) masih terdapat senyawa sekunder seperti flavonoid dan tanin yang mempunyai sifat antioksidan yang larut dalam air dan turut terekstraksi (Santoso *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2011), dibandingkan dengan protein isolat (Gg-PI) yang diharapkan hanya mengandung protein (protein murni dengan konsentrasi tinggi). Struktur dari protein isolat (Gg-PI) lebih kompleks sehingga kemampuan untuk mengikat radikal bebas menjadi lebih kecil.

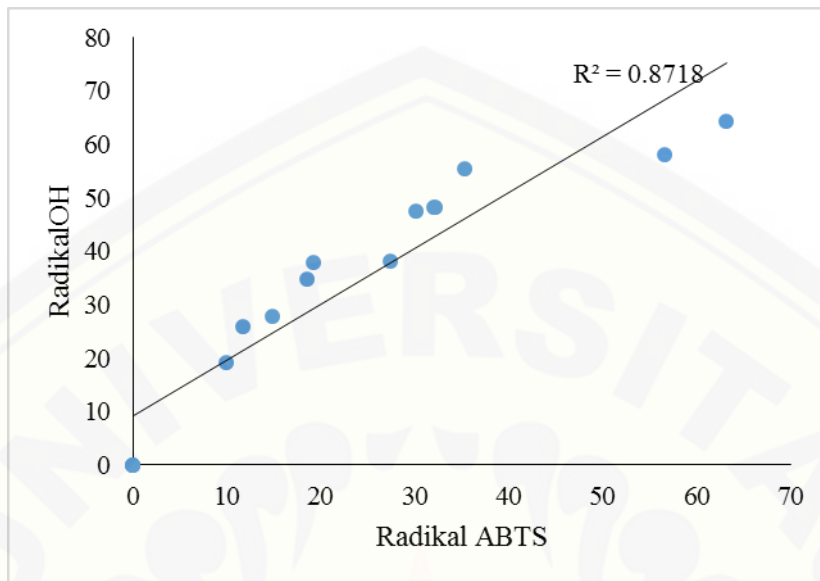
Tabel 4.4 Nilai  $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) pada Pengujian Radikal Hidroksil dari Protein Biji Melinjo

SAMPEL UJI	Nilai $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Gg-PK	$8,7 \pm 0,3$
Gg-PI	$17,5 \pm 2,3$
Gg-PH	$4,4 \pm 0,2$

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa terjadi perbedaan nilai  $IC_{50}$  atau kemampuan protein antioksidan pada protein biji melinjo dalam meredam 50% radikal hidroksil dari masing-masing tahapan pemurnian protein. Dari hasil pengujian radikal hidroksil nilai  $IC_{50}$  pada sampel protein kasar (Gg-PK) diperoleh sebesar  $8,7 \pm 0,3$   $\mu\text{g/mL}$ ,

protein isolat (Gg-PI) diperoleh sebesar  $17,5 \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$ , dan protein terhidrolisis (Gg-PH) diperoleh sebesar  $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ . Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) mempunyai tingkat peredaman radikal bebas paling efektif dibandingkan dengan tahapan pemurnian protein lainnya, karena pada konsentrasi  $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  tingkat peredaman radikal hidroksil mencapai 50%. Kemampuan dari protein terhidrolisis yang efektif berikatan dengan radikal hidroksil tidak terlepas dari proses hidrolisis enzimatis yang menghasilkan bioaktif peptida. Bioaktif peptida tersusun atas asam amino rantai pendek yang aktivitasnya bergantung pada komposisi dan urutan asam amino (Jae *et al.*, 2007). Berat molekul rendah dalam konsentrasi tinggi memberikan hasil peredaman radikal hidroksil yang lebih baik dibandingkan dengan berat molekul besar pada konsentrasi tinggi. Hidrolisis enzimatis meningkatkan kemampuan fungsional dari protein untuk mendonorkan elektron pada radikal bebas dibandingkan dengan protein native (Yu *et al.*, 2015).

Aktivitas peptida antioksidan mungkin bergantung kepada protease yang dipergunakan dalam proses hidrolisis enzimatis, besarnya derajat hidrolisis (DH) protein, kandungan asam amino alami dalam tanaman (distribusi berat molekul, komposisi dan susunan asam amino), atau kombinasi diantaranya. Ukuran peptida jelas memegang peranan yang penting, dimana sebagian besar peptida yang bersifat antioksidan merupakan peptida pendek yang tersusun atas 3-16 asam amino (Jae *et al.*, 2007). Komposisi asam amino pada biji melinjo yang sebagian besar tersusun atas *Phe*, *His*, *Pro*, *Met*, *Ile*, dan *Cys* yang mungkin memiliki korelasi dengan besarnya aktivitas antioksidan (Siswoyo *et al.*, 2007).



Gambar 4.5 Korelasi hasil (%) peredaman radikal ABTS dan radikal hidroksil (OH) pada sampel biji melinjo

Korelasi hasil (%) peredaman radikal ABTS dan radikal hidroksil (OH) pada gambar 4.5 didapatkan koefisien korelasi  $r^2=0,8718$ . Besar korelasi  $r=0,8718$  berada pada rentang 0,75-0,99, hal ini menunjukkan bahwa arah korelasi bersifat positif dan keeratan hubungan yang sangat kuat. Artinya semakin tinggi hasil (%) peredaman radikal ABTS maka aktivitas peredaman radikal hidroksil (OH) cenderung semakin besar pula pada sampel uji protein biji melinjo yang digunakan dalam penelitian ini.

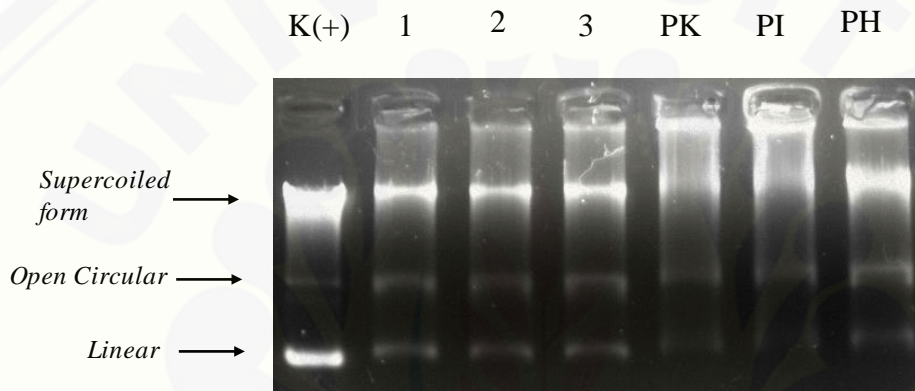
#### 4.7 Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo

Radikal hidroksil memiliki peranan penting dalam stress oksidatif pada sel, kerusakan DNA, kanker, penuaan dini, dan penyakit neuro degeneratif seperti Alzheimer dan Parkinson. Antioksidan menghambat oksidasi melalui dua cara, yaitu: memutuskan rantai ikatan radikal (*direct radical quenching/scavenging*) atau sebagai *metal chelating* (sebagai katalis) (Louis *et al.*, 2014).

Pengujian model kerusakan DNA (pemutusan ikatan rangkap) bertujuan untuk melihat kemampuan antioksidan dalam melindungi DNA dari kerusakan yang



diakibatkan oleh radikal hidroksil. Radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi fenton yang bersifat oksidatif dan menimbulkan kerusakan DNA dengan pemotongan ikatan rangkap (*side H*). Pada reaksi fenton,  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi  $\text{OH}\cdot$  melalui reaksi  $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ .  $\text{OH}\cdot$  yang bersifat reaktif dan merupakan spesies oksidatif yang menyebabkan perubahan struktur *supercoiled* plasmid DNA menjadi *open circular* dan *linear* tipis dalam elektroforesis gel *agarose* 1%. (Arnao, 2000; Louis *et al.*, 2014)



Gambar 4.6 Efek Proteksi Protein Biji Melinjo pada *Supercoiled pBluescript* Plasmid DNA. Kontrol Positif tanpa perlakuan (K(+)); Plasmid DNA + Reaksi Fenton pada 5 menit, 10 menit, dan 15 menit (Garis 1, 2, dan 3); Plasmid DNA + Reaksi Fenton + Gg-PK (PK); Plasmid DNA + Reaksi Fenton + Gg-PI (PI); Plasmid DNA + Reaksi Fenton + Gg-PH (PH)

Gambar 4.5 terdiri dari K(+) sebagai kontrol plasmid DNA tanpa perlakuan menunjukkan 3 pita, *supercoiled*, *open circular* dan *linear*. Plasmid DNA + *fenton reaction* menunjukkan perubahan *supercoiled* DNA menjadi *open circular* dan *linear* berdasarkan perbedaan waktu 5, 10, dan 15 menit. Penambahan masing-masing 15  $\mu\text{g}$  ekstrak protein biji melinjo Gg-PH, Gg-PI, dan Gg-PH menunjukkan penghambatan paling efektif proses oksidasi DNA oleh reaksi fenton yang ditunjukkan dengan semakin tebalnya pita *supercoiled* plasmid DNA yang terbentuk.

Protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) memiliki aktivitas penghambatan yang paling efektif dengan sedikitnya pembentukan *open circular* dan *linear*. Hal ini

sesuai dengan hasil diskusi sebelumnya, bahwa pada pengujian peredaman radikal hidroksil, Gg-PH mempunyai aktivitas penghambatan paling efektif dibandingkan dengan tahapan pemurnian protein yang lain. Inhibisi perubahan *supercoiled* DNA yang diinduksi oleh radikal hidroksil terjadi melalui dua mekanisme, yaitu: mekanisme katalis (*metal chelating*) protein kepada ion  $Fe^{2+}$  sehingga menghambat dekomposisi (penguraian)  $H_2O_2$  menjadi  $OH^-$  dan  $OH^\bullet$  serta besarnya kapasitas protein hidrolisat yang mampu berikatan dengan  $OH^\bullet$  hasil dari reaksi fenton (Yu *et al*, 2015).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, didapatkan beberapa kesimpulan antara lain:

1. Karakter protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) memiliki aktivitas peredaman radikal hidroksil paling tinggi diantara sampel tahapan pemurnian protein lainnya, ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ .
2. Protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) memiliki kemampuan dalam melindungi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil.

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui fraksi protein biji melinjo yang paling efektif menghambat radikal bebas.
2. Perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji *in vivo*, uji toksisitas, dan uji klinis agar protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dapat dimanfaatkan secara maksimal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adler-Nissen, Jens. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 1979, 27 (6), 1256-1262
- Araujo, V., Arnal, C., and Boronat, M. 1998. Oxidant-Anti Oxidant Imbalance In Blood of Children with Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Bio Factor*. 8: 155-59.
- Arnao, MB. 2000. Some Methodological Probles in the Determination of Antioxidant Activity using Chromogen Radical: a Practical Case. *Trends Food Sci. Technol.* 11:419-421.
- Bradford, MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254 (1976)
- Cadiz, R. T. and Florido, H. B. 2001. Bago: *Gnetum gnemon Linn.* Research Information System.
- Calliet and Stephane, R. 2004. *Fenton Reaction Applied for Screening Natural Antioxidant.* Canadian Irradiation Center, Canada
- Cano, Antonio. 2007. *On-line Antioxidant Activity Determination: Comparison of Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Activities using ABTS<sup>+</sup> Assay.* Dept Plant Physy. University of Marcua, Spain.
- Carthy, Mc Aoife L., Yvonne C. O' Challengaan and Nora M. O' Brien. 2013. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops-Bioactivity and Potential for Function Food Development. *J. Agriculture*
- Clarkson, P.M., Thompson, H.S. 2000. *Antioxidants: What role do they play in physical activity.* Cold Spring Harbour: Spain.
- Davis, Jennifer D. and Lin, Shiaw-Yih. 2011. DNA damage and breast cancer. *World J Clin Oncol* 2(9): 329-338
- Departemen Kesehatan RI. 2014. *Gambaran penyakit tidak menular di rumah sakit di Indonesia tahun 2009-2014.* Depkes RI; Jakarta

- Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI. 1996. *Kandungan Gizi melinjo*. Jakarta: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI.
- Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Departemen Kesehatan RI. 2013. *Informasi Penyakit*. Dirjen. P2PL: Jakarta
- Dunn, MJ. 1989. *Determination of Total Protein Concentration and Protein Purification Methods*. IRI Pers Oxford; England
- Elias RJ, McClements DJ, and Decker EA. 2008. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase  $\beta$ -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:10248–10253.
- Felig, P., and Lawrence, C.A.S. 2001. *Endocrinology and Metabolism*. (4<sup>th</sup> Edition). New York: Mc.Graw Hill.
- Girindra, Aisjah. 2000. *Biokimia I*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Handajani, Adianti, Roosihermiatie, Betty, dan Herti Maryani. 2009. *Faktor-faktor yang berhubungan dengan pola kematian pada penyakit degeneratif di Indonesia*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Sistem dan Kebijakan Kesehatan, BPPK: Surabaya.
- Hames, B.D. 1987. *Gel Electrophoresis of Protein: "Practical Approach"*. IRL Press: Oxford
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., and Aruoma, O.I. 1987. The Deoxyribose Method: A Simple "Test Tube" Assay for Determination of Rate Constant for Reaction of Hydroxyl Radicals. *Anal Biochem*, 165, 215-219. London. Academic Press.
- Halliwell, B. 2002. Food Derived Antioxidants: How to Evaluate Their Importance in Food and In Vivo. *Handbook of Antioxidant p1-33*. University of Southern California Scholl of Pharmacy. Los Angles California
- Harnita, Agnes. 2007. *Uji Penangkapan Radikal Hidroksil oleh Fraksi Air dari Ekstrak The Hitam dan Vitamin C secara In Vitro dengan Metode Deoksiribosa*. Skripsi. Tidak dipublikasikan. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.

- Henenburg, Iris H.J., Damien Doman, Raimo, and Hilltunen. 2006. Antioxidant Activities of Extract from Selected Culinary Herbs and Spices. *Food Chem* 2006 (2): 1334-1342
- Hoo L. L. See, S. F. and Babji, A. S.2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *International Food Research Journal* 18(4): 1359-1365
- Jae, Yong Je, Zhong-Ji Qian, Hee-Guk Byun, and Se-Kwon Kim. 2007. Purification and Characteristic of an Antioxidant Peptide Obtained from Tuna Backbone Protein by Enzymatic Hydrolysis. *Process Biochem*
- John, EC. 2000. Bradford for checking protein assay on mixed biological samples (techniques and instrumentation in analytical chemistry). *Elsevier Science*, 19(8): 83 92
- Kaiser, ET. 1997. *Peptide and Protein Structure*. Oxford Journal
- Kato, H., Sarmizo, M., Kawabata, R., and Takano, F. 2011. Stilbenoids from the Melinjo (*Gnetum gnemon*) Fruit Modulate Cythokine Production in Murine Payer's Patch Cell ex Vivo. *Planta Med.* Vol 77 (10); 1027-1034
- Khairul, Anam. 2009. SDS-PAGE with Silver Staining and Zimogram. *J. Biotech.* IPB Bogor
- Kumar, G. Phani, K. Navya, Aldiano, and Grace, K. 2013. DNA Damage Protecting and Free Radical Scavenging Properties of *Terminalia arjuna* in PC-12 cells and Plasmid DNA. *Journal of Free Radical and Antioxidant*
- Khopkar S. 2007. *Konsep Dasar Biokimia*. Jakarta (ID): UI Press.
- Kong J, Yu S. 2007. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis Protein Secondary Structure. *Acta Biochem* 39 (8) 2007: 549-559
- Kunchandy, E. and Rao, M.N.A 1990. Oxygen Radical Scavenging Activity of *Curcumin*. *Int. J. of Pharm*, 58 (1) 1990: 237-240.
- Kunchandy, E. and Rao, M.N.A 1989. Effect of *Curcumin* on Hydroxyl Radical Generation through Fenton Reaction. *Int. J. of Pharm*, 57 (1) 1989: 173-176.
- Laemmli. 1970. *Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Proteomics of Cerebrospinal Fluid*. Vrije Universiteit Amsterdam

- Louis-Jerome Leba, Christel Brunshwig, Mona Saout, Karine Martial, Emmanuelle Vulcain, Didier Bareau, and Jean-Charles Robinson. 2014. Optimazion of a DNA nicking Assay to Evaluate *Oenocarpus bataua* and *Camellia sinensis* Antioxidant Capacity. *Int. J. Mol. Sci.*
- Lu, Jiang-Ming, Peter H. Lin., Qizhi Yao, and Changyi Chen. 2010. Chemical and Molecular Mechanism of Antioxidant: Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell Mol Med* Vol 14 (4): 840-860.
- Marks, Dawn B., Marks, Allan D., and Colleen M. Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. EGC: Jakarta
- Martinez GR. 2003. Oxidative and Alkylating Damage in DNA. *Mutat Res.* 544 2003:115-127.
- Maryono D. 2008. *Mitos dan Fakta Seputar Penyakit Degeneratif*. Jakarta: Bhuana Ilmu Populer.
- McBride, J.M., and Kraemer, W.J. 1999. Free Radical, Exercise, and Antioxidant. *J. Strength Cond. Research*, 13(2) 1999: 175-183.
- Ming, Jian-Lu, Peter H. Lin, Qizhi Yao, and Changyi Chen. 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med.* 2010 Apr; 14(4) 2010: 840–860.
- Molina Ortiz, SE., and Wagner, J.R. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *J. Food Research* 35 (6) 2002:511-518
- Muhamyankaka, V. Shoemaker. C.F, Nalwoga M., and Zhang X.M. 2013. Physicochemical Properties of Hydrolysates from Enzymatic Hydrolysis of Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Protein Meals. *Int. Food Research J.* 20 (5) 2013:227-2240
- Murray-Zmijewski, F., D. P. Lane and J. C. Bourdon. 2003. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ.* 13 2003: 962–972
- National Tripical Botanical Garden. 2015. *Meet the Plant: Gnetum gnemon* L. [[http://www.ntbg.org/plants/plant\\_details.php?plantid=5570](http://www.ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=5570)] Diakses pada 05 Maret 2015.

- Neide KKK, Goncalves MM, Zaia CTBV, Zaia DAM. 2003. Determination of total proteins in cow milk powder samples: a comparative study between the Kjeldahl method and Spectrophotometric method. *Journal of Food Composition and Analysis* 16(8) 2003: 507-516.
- Nielsen, S. 2001. "Introduction to Food Analysis" Dalam S. Nielsen (Ed). 2010. *Food Analysis*. Springer Science: New York.
- Nielsen, M., Lundegaard C., Lund O., and Patersen TN. 2001. CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Oxford Journal* 38 (1) 2001:117-128
- Notoatmodjo. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineke Cipta.
- Oh, N.S. H.A. Lee, J. Y. Joung, K. B. Lee, Y. Kim, K. W. Lee, and S. H. Kim. 2013. The Dual Effect of Maillard reaction and Enzymatic Hydrolysis on the Antioxidant Activity of Milk Protein. *J. Dairy Sci.* ADSA.
- Pace, C Nick, Saul Trevino, Erode Prabhakaran and J. Martin. 2004. Protein structure, Stability, and Solubility in Water and Other Solvents. *Phil. Trans. R. Sac. Land.* The Royal Society.
- Pazil, S. N. 2009. *Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daging Pisang Raja (Musa AAB 'Pisang Raja') Dengan Vitamin A, Vitamin C, dan Katekin Melalui Penghitungan Bilangan Peroksida*. Tidak Dipublikasikan. Skripsi. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Proctor, P. H. and Reynolds, E. S. 2007. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys Med.* 16; 1984:175-95.
- Prangdimurti, E. 2007. *Metode Evaluasi Antioksidan Secara In Vitro dan In Vivo*. Bogor: Departemen ilmu dan teknologi pangan Fakultas Teknologi Pertanian ITB.
- Pryor, W.A. 1988. Why is the Hydroxyl Radical the only Radical that Commonly adds to DNA?. *J. Bio. Chem.*
- Re, Roberta., Rellegrini, Anna Proteggente, Min Yang, Caterine. 1998. Antioxidant Activity Applying in Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *International Antioxidant Research Center*. Kinga College-Guy's Campus, London

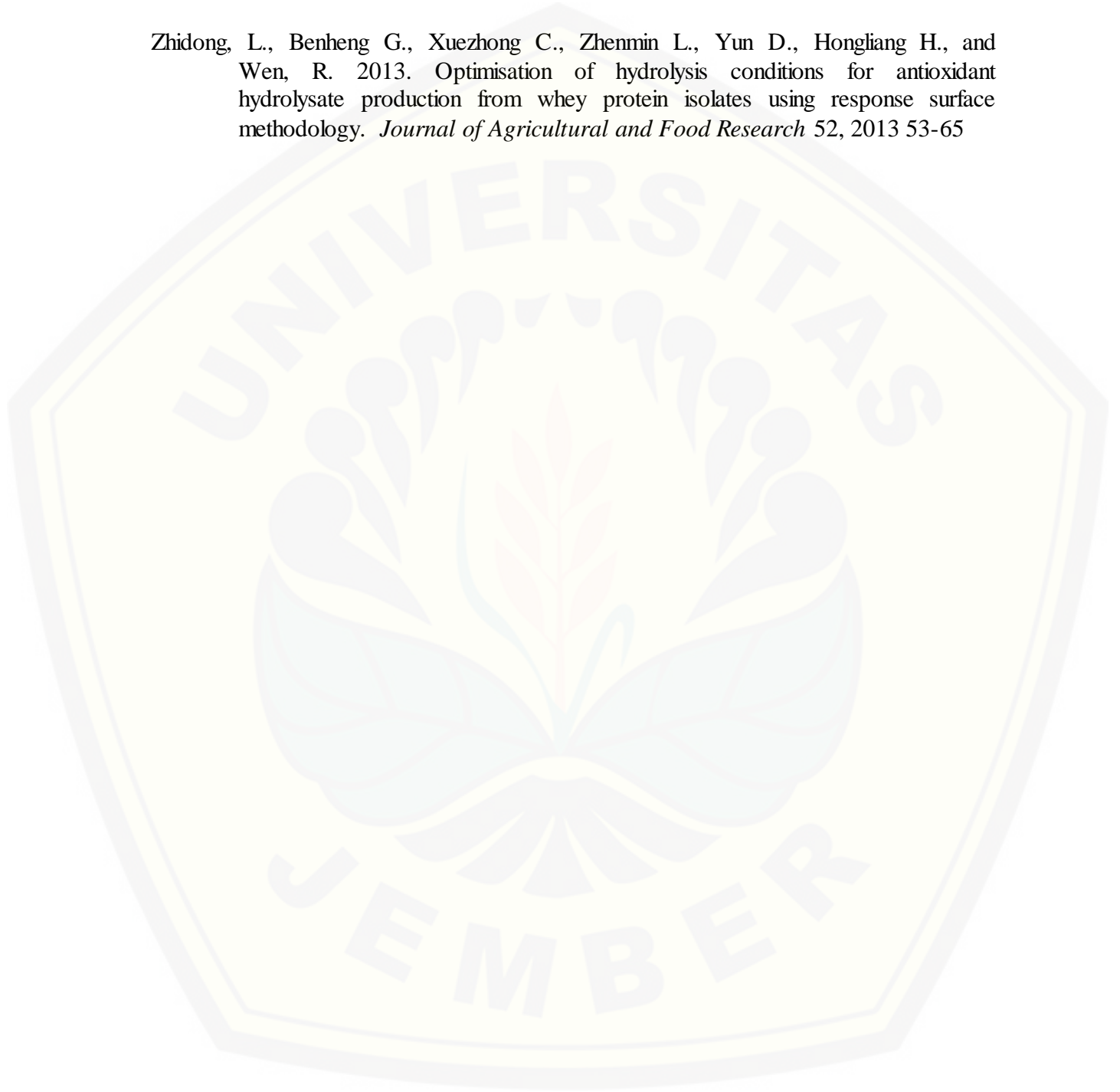


- Rooma, C. Asha., Rermi M.S., and E.V. Soniya. 2012. In vitro Antioxidant Analysis and the DNA Damage Protective Activity of Leaf Extract of the *Excoecaria agallocha* Linn Mangrove Plant. *Molecular Biology*. Gov India.
- Santoso, M., Naka, Y., Angkawidjaja, C., Yamaguchi, T., Matoba, T., and Takamura, H. 2010. Antioxidant and DNA Damage Prevention Activities of the Edible Parts of *Gnetum gnemon* and Their Change Upon Heat Treatment. *Food Sci. Technol. Res.* Vol 16 (6); 549-556
- Sattayasai, Nison. 2012. *Protein Purification using SDS-PAGE*. Khon Kaen University: Thailand
- SCL. 2009. *Agarose Gel Electrophoresis*. [<http://www.bioinformatics.nl/molbi/SimpleCloningLab/Electrophoresis.htm>] Diakses pada 29 September 2014.
- Shi, Huahong., Sui, Yunxia., Xiaorong Wang, Yi Luo, and Liangliang Ji. 2005. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*. *Comparative Biochem and Phy Part C: Toxicology and Pharm* 40(1) 2005: 115-121
- Shimada, K., Fujikawa K., Yahara K., and Nakamura T. Antioxidative Properties of Xanthone on the Auto Oxidation of Soybean in Cyclohexanone Emulsion. *J. Agr Food Chem* 1992: 40:945-948
- Siswoyo, T.A. & 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. Oktaviandri, 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.
- Siswoyo, T. A., Mardiana, E., Lee, K., and Hoshokawa, K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seeds. *ACS Publications. J. Agric. Food Chem* 59: 5648-5656.
- Siswoyo, T. A, Madios Aldiano, and Hoshokawa. 2012. Free Radical Scavenging Activity and DNA Damage Protective Effect of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Journal of Medicine Plants Research*. Academic Journal

- Susanto, Agus Heri. 2012. *Bahan Ajar Biologi Molekular*. Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman, Purwokerto.
- Stoscheckk CM. 1990. Increased Uniformity in the Response of the Coomassie Blue Protein Assay to Different Proteins. *Analytical Biochemistry*. 18(4) 111-116.
- Thomas, Carin, and, Amy Diaz. 2012. *Hydroxyl Radical is Produced via Fenton Reaction in Submitochondrial Particles under Oxidative Stress: Implication for Disease Associated with Iron Accumulation*. Dept of Chemistry, Central Washington. USA
- Tahir, I., Wijaya, K., dan Widianingsih, D. 2003. *Terapan Analisis Hansch untuk Aktivitas Antioksidan senyawa Turunan Flavon/ Flavonol*. Yogyakarta: Departemen Kemometrika Kimia Universitas Gadjah Mada.
- Waji, RA dan Sugrani, A. 2009. *Makalah Kimia Organik Bahan Flavonoid (Quercetin)*. Makasar: Universitas Hasanuddin.
- Wang, Wen-Bin, Yun-Hee Kim, Haeng-Soon Lee, Ki-Yong Kim, Xi-Ping Deng, Sang-So Kwak. 2009. Analysis of Antioxidant Enzyme Activity during Germination of Alfafa under Salt and Drought Stress. *Plant Physiology and Biochem*. 47: 550-577.
- Widayati, Eni. 2012. Oksidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioksidan. Skripsi Tidak Dipublikasikan. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung
- Wilson K., and Walker, JM. 1994. *Protein and Enzym Technique in Practical Biochemistry*. Cambridge University Pers p:161-226
- World Health Organization. 2014. *Chronic Diseases and Health Promotion*. World Health Organization: Jenewa
- Xiong, Youling L. Cheng, Yu., and Jie Chen. 2009. Antioxidant and emulsifying properties of potato protein hydrolysate in soybean oil-in-water emulsions. *Food Chem* 120 (1) 2010: 101-108
- You, Rem, Argly M., Sunxiang, C. and Roome. 2002. Protective Effect of Metallothionein-III on DNA Damage in Response to Reactive Oxygen Species. *Biochim. Biophys. Acta* 1573:33-36.
- Yu, Xiao, Lixia Wang, Xing Rui, Wei Li, Xiahong Chen, Mei Jiang, and Mingsheng dong. 2015. Enhancement of the Antioxidant Capacity of Soy Whey by

Fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *Jurnal of Functional Food*.

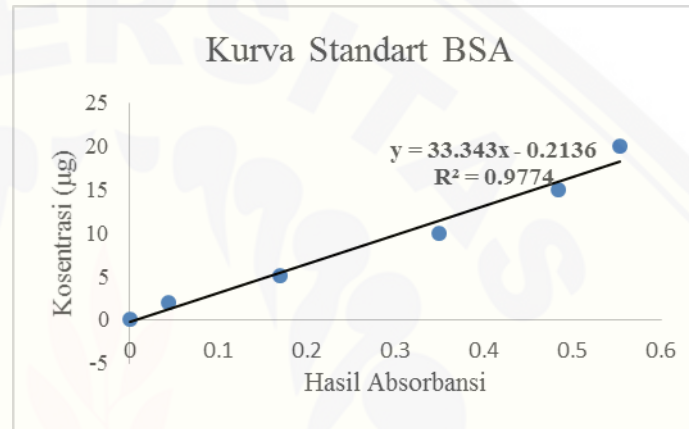
Zhidong, L., Benheng G., Xuezhong C., Zhenmin L., Yun D., Hongliang H., and Wen, R. 2013. Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Research* 52, 2013 53-65



Lampiran A. Penghitungan Kandungan Protein Biji Melinjo

A.1 Standar BSA untuk Penentuan Protein Terlarut

Konsentrasi BSA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Hasil Absorbansi
0	0
2	0.043
5	0.169
10	0.349
15	0.484
20	0.553



A.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut

SAMPSEL	ABSORBANSI			KOSENTRASI ( $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )			KOSENTRASI ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )			RERATA KONSENTRASI ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	VOLUME (mL)	JUMLAH PROTEIN (mg)
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3			
CE	1.418	1.428	1.383	47.07	47.40	45.90	9.41	9.48	9.18	$9.36 \pm 0.16$	63	592,2
PI	1.765	1.74	1.712	58.64	57.80	56.87	11.73	11.56	11.37	$11.55 \pm 0.18$	21	243,6
PH	0.628	0.624	0.6	20.73	20.59	19.79	4.15	4.12	3.96	$4.07 \pm 0.10$	11	45,1

## Lampiran B. Aktivitas Peredaman Radikal ABTS

## B.1 Perhitungan aktivitas peredaman radikal ABTS

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi			Peredaman (%)			Average	STDEV
Gg-PK	0	0.748	0.763	0.756					
	2	0.679	0.676	0.678	9.22	11.40	10.32	10.32	1.09
	4	0.626	0.616	0.621	16.31	19.27	17.80	17.79	1.48
	6	0.579	0.563	0.571	22.59	26.21	24.42	24.41	1.81
	8	0.504	0.543	0.524	32.62	28.83	30.71	30.72	1.89
	10	0.479	0.498	0.489	35.96	34.73	35.34	35.34	0.62
Gg-PI	0	0.747	0.764	0.756					
	2	0.685	0.675	0.680	8.30	11.65	9.99	9.98	1.67
	4	0.652	0.639	0.646	12.72	16.36	14.56	14.55	1.82
	6	0.606	0.604	0.605	18.88	20.94	19.92	19.91	1.03
	8	0.556	0.552	0.554	25.57	27.75	26.67	26.66	1.09
	10	0.573	0.462	0.518	23.29	39.53	31.50	31.44	8.12
Gg-PH	0	0.747	0.788	0.768					
	2	0.627	0.634	0.631	16.06	19.54	17.85	17.82	1.74
	4	0.52	0.531	0.526	30.39	32.61	31.53	31.51	1.11
	6	0.458	0.417	0.438	38.69	47.08	43.00	42.92	4.20
	8	0.35	0.344	0.347	53.15	56.35	54.79	54.76	1.60
	10	0.296	0.289	0.293	60.37	63.32	61.89	61.86	1.48

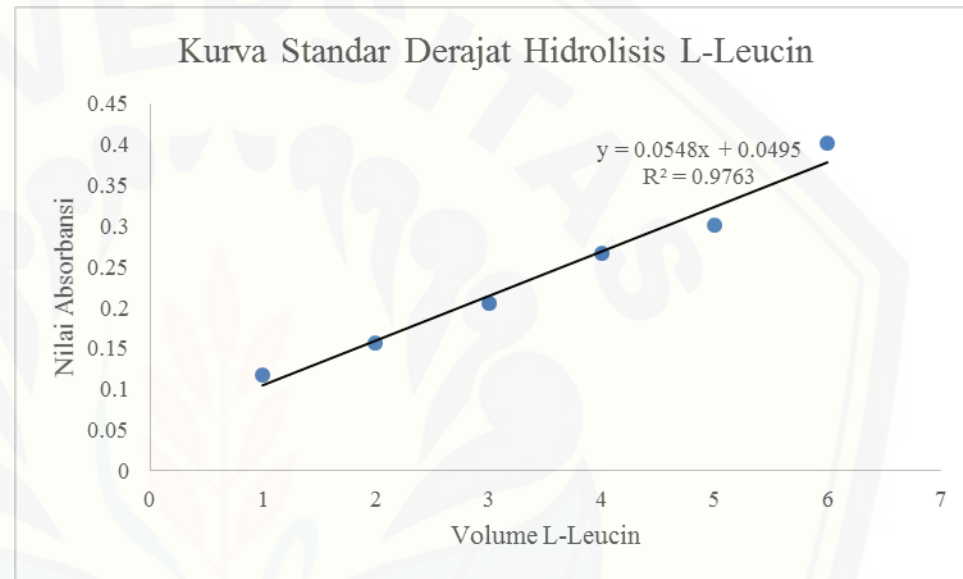
## Lampiran C. Perhitungan Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil

Sampel	Konsentrasi ( $\mu\text{g}$ )	Absorbansi			Peredaman (%)			Average	STDEV
Gg-PK	0	0.745	0.8	0.773					
	0.5	0.679	0.719	0.709	8.86	10.13	8.22	9.07	0.97
	1	0.646	0.668	0.657	13.29	16.50	14.95	14.91	1.61
	2	0.564	0.579	0.572	24.30	27.63	26.02	25.98	1.67
	4	0.499	0.516	0.508	33.02	35.50	34.30	34.27	1.24
	8	0.39	0.399	0.400	47.65	50.13	48.22	48.67	1.30
	10	0.307	0.32	0.301	54.79	55.49	57.55	55.94	1.43
Gg-PI	0	0.789	0.801	0.756					
	0.5	0.746	0.734	0.740	3.49	5.05	2.12	3.55	1.47
	1	0.697	0.704	0.701	9.83	8.93	7.34	8.70	1.26
	2	0.633	0.644	0.639	18.11	16.69	15.54	16.78	1.29
	4	0.556	0.579	0.568	28.07	25.10	24.93	26.03	1.77
	8	0.473	0.495	0.474	40.05	38.20	37.30	38.52	1.40
	10	0.405	0.425	0.415	47.61	45.02	45.11	45.91	1.47
Gg-PH	0	0.768	0.773	0.793					
	0.5	0.633	0.643	0.638	18.11	16.82	19.55	18.16	1.36
	1	0.56	0.569	0.565	27.55	26.39	28.81	27.59	1.21
	2	0.483	0.5	0.492	37.52	35.32	38.02	36.95	1.44
	4	0.425	0.402	0.414	45.02	47.99	47.86	46.96	1.68
	8	0.369	0.322	0.329	52.26	58.34	58.51	56.37	3.56
	10	0.279	0.282	0.281	63.91	63.52	64.63	64.02	0.56

## Lampiran D. Perhitungan Derajat Hidrolisis

## D.1 Standar derajat hidrolisis dengan Leucin

KONSENTRASI L-LEUCIN ( $\mu\text{L}$ )	ABSORBANSI
0	0
1	0.117
2	0.156
3	0.205
4	0.267
5	0.331
6	0.401



## D.2 Hidrolisis asam Gg-PI

- Tujuan : memotong seluruh ikatan peptide  
 Prinsip : sampel + HCl → konsentrasinya 6 M HCl  
 Langkah : 10 M HCl diencerkan menjadi 6 M HCl

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$10 \text{ M} \times V_1 = 6 \text{ M} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 300 \mu\text{L}$$

Jadi 10 M HCl diambil sebanyak 300  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan sampel Gg-PI sebanyak 200  $\mu\text{L}$ , kemudian diinkubasi 110 C selama 24 jam. Hasil hidrolisis Gg-PI secara asam disebut sebagai Gg-PI<sub>(asam)</sub>

## D.3 Penghitungan derajat hidrolisis

### ➤ Diketahui:

$$\text{Konsentrasi Gg-PI} = 11,6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

### ➤ Total asam $\alpha$ -amino Gg-PI yang dihidrolisis secara asam (Gg-PI<sub>(asam)</sub>)

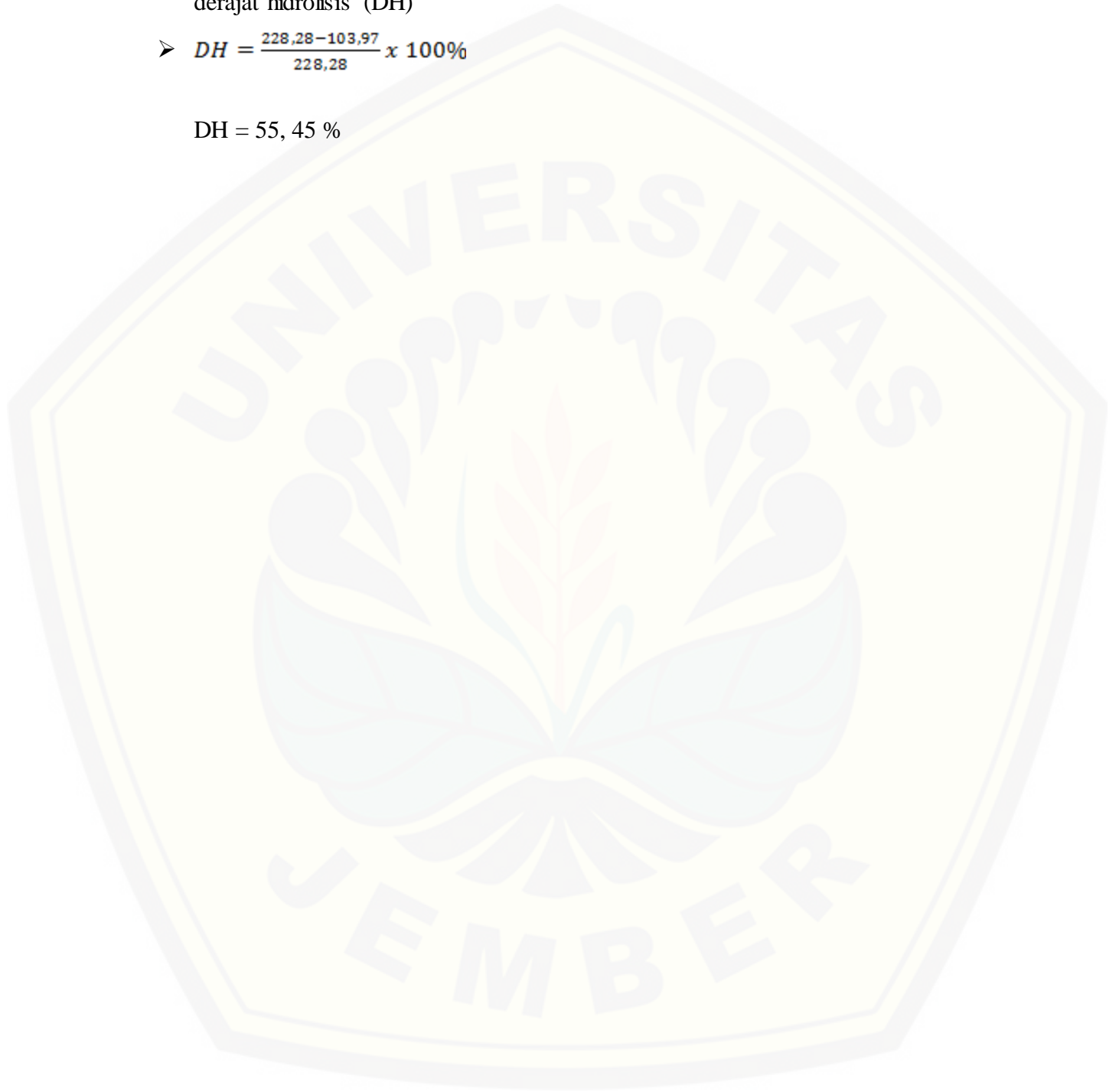
- 200  $\mu\text{L}$  Gg-PI + 300  $\mu\text{L}$  10 M HCl = 500  $\mu\text{L}$  Gg-PI<sub>asam</sub> dengan jumlah protein yang dimasukkan 2,32 mg
  - Gg-PI<sub>asam</sub> yang diencerkan 10X untuk pengukuran  $\alpha$ -amino menggunakan metode TNBS (10  $\mu\text{L}$  Gg-PI<sub>asam</sub> dalam 90  $\mu\text{L}$  aquadest) = Gg-PI<sub>asam</sub>10X
  - Absorbansi 25  $\mu\text{L}$  Gg-PI<sub>asam</sub>10X pada  $\lambda_{420}$  (TNBS) = 0,712 sehingga jumlah asam  $\alpha$ -amino dalam 25  $\mu\text{L}$  Gg-PI<sub>asam</sub>10X = 6,62  $\mu\text{g}$
  - Total asam  $\alpha$ -amino terlarut sebesar 66,2  $\mu\text{g}$ / 290  $\mu\text{g}$  protein atau 228,28 mg/g protein
- ### ➤ Total asam $\alpha$ -amino terlarut Gg-PH
- Gg-PH diencerkan 5X untuk pengukuran  $\alpha$ -amino menggunakan metode TNBS (10  $\mu\text{L}$  Gg-PH dalam 40  $\mu\text{L}$  aquadest) = Gg-PH<sub>5X</sub>
  - Absorbansi 25  $\mu\text{L}$  Gg-PH<sub>5X</sub> pada  $\lambda_{420}$  (TNBS) = 0,653 sehingga jumlah asam  $\alpha$ -amino dalam 25  $\mu\text{L}$  Gg-PH<sub>5X</sub> = 6,03  $\mu\text{g}$
  - Asam  $\alpha$ -amino terlarut Gg-PH = 30,15  $\mu\text{g}$ / 290 mg protein



➤ Jadi asam  $\alpha$ -amino terlarut Gg-PH yaitu 103,97 mg/g protein  
Penghitungan derajat hidrolisis (DH)

➤  $DH = \frac{228,28 - 103,97}{228,28} \times 100\%$

DH = 55,45 %



## Lamiran E. Komposisi Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

## E. 1 Komposisi buffer fosfat pH 8

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	5,3 mL
0,2 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	94,7 mL
Aquadest	sampai 200 mL

## E. 2 Komposisi pereaksi Bradford

CBB G-250	100 mg
Etanol 95%	50 mL
Asam Fosfat 85%	100 mL
Aquadest	sampai 1000mL

## E. 3 Komposisi SDS-PAGE

*Separating gel 15%*

Akrilamida (30% T, 2,7% C)	5mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL
TEMED	5 $\mu\text{L}$
10% APS	50 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}$	2,445 mL

*Stacking gel*

Akrilamida (30% T, 2,7% C)	0,45 mL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,75 mL
TEMED	4,5 $\mu\text{L}$
10% APS	1,8 mL
$\text{H}_2\text{O}$	

## Stok sampel buffer

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,2 mL
Gliserol	1 mL
10% SDS	2 mL
0,5% Bromofenol Blue	0,5 mL

Aquadest	4,8 mL
<i>SDS-reducing buffer</i>	
2-merkaptoetanol	50 $\mu$ L
Stok sampel buffer	0,95 mL
<i>Running buffer</i>	
0,025 M Tris base	0,3 g
0,192 M Glisin	1,4 g
0,1% (w/v) SDS	1 mL
Aquadest	sampai 100 mL
<i>Larutan staining</i>	
CBB R-250	0,1 g
Metanol	40 mL
Asam asetat	10 mL
Aquadest	sampai 100 mL
<i>Larutan destaining</i>	
Metanol	40 mL
Asam asetat	10 mL
Aquadest	sampai 100 mL
E. 4 Komposisi media cair Luria Bertani pH 7	
Tryptone	10 g
NaCl	5 g
Yeast	5 g
Aquadest	sampai 100 mL
E. Komposisi gel Agarose 1%	
TBE	25 mL
Agarose L	0,25 g
Etidium Bromide	4 $\mu$ L

Lamran F. Pengujian Statistik Data Penelitian

F.1 Uji normalitas data

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	1.058	.802		1.319	.206
	Penghambatan ABTS	.164	.027	.835	6.063	.000

a. Dependent Variable: Konsentrasi

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Unstandardized Residual
N		18
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.0000000
	Std. Deviation	1.93554521
Most Extreme Differences	Absolute	.198
	Positive	.198
	Negative	-.113
Kolmogorov-Smirnov Z		.841
Asymp. Sig. (2-tailed)		.479

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-.947	.639		-1.481	.155
	peredaman OH	.164	.019	.896	8.803	.000

a. Dependent Variable: konsentrasi

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Unstandardized Residual
N		21
Normal Parameters <sup>a,b</sup>	Mean	.0000000
	Std. Deviation	1.65164145
Most Extreme Differences	Absolute	.119
	Positive	.119
	Negative	-.085
Kolmogorov-Smirnov Z		.547
Asymp. Sig. (2-tailed)		.926

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

**F.2 Uji Korelasi Bivariat Sederhana**

**Correlations**

		Peredaman ABTS	Konsentrasi
Peredaman ABTS	Pearson Correlation	1	.832**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	18	18
Konsentrasi	Pearson Correlation	.832**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	18	18

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

**Correlations**

		Peredaman ABTS	Konsentrasi
Peredaman ABTS	Pearson Correlation	1	.896**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	21	21
Konsentrasi	Pearson Correlation	.896**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	21	21

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

F.3 Uji *One Way* ANOVA**Test of Homogeneity of Variances**

Peredaman ABTS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.934	2	15	.179

**ANOVA**

Peredaman ABTS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3836.830	5	767.366	5.794	.006
Within Groups	1589.371	12	132.448		
Total	5426.201	17			

**Test of Homogeneity of Variances**

Peredaman OH

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.236	6	14	.346

**ANOVA**

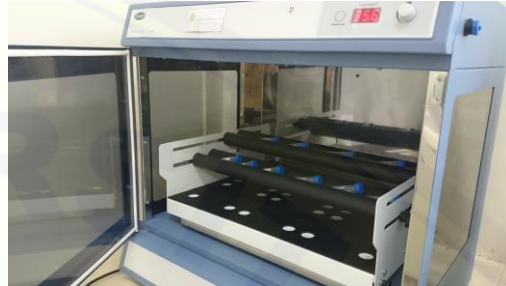
Peredaman OH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7386.745	6	1231.124	18.676	.000
Within Groups	922.897	14	65.921		
Total	8309.642	20			

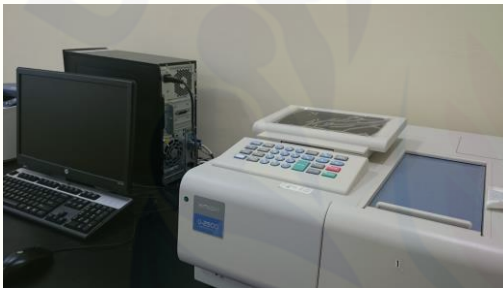
Lampiran G. Dokumentasi Penelitian



pH Meter & *Magnetic Strirrer*



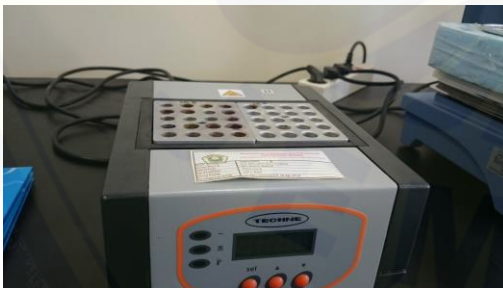
*Shaker Inkubator*



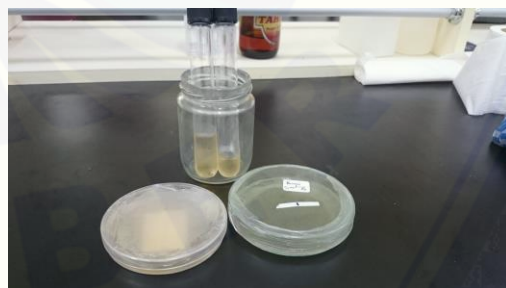
Spektrofotometer UV-Vis



Sentrifuse Hitachi CF15AXZ



Dry Block Heater



Media LB Cair dan Kultur PBluescript