

LAPORAN PENELITIAN

(Tahun I)

RISET PENGEMBANGAN ILMU PENGETAHUAN DAN TEKNOLOGI (IPTEK)



JUDUL PENELITIAN

**PRODUKSI ARTIFISIAL PEPTIDE ANTIHYPERTENSI MELALUI EKSPRESI
GEN *Gg-Ah3* PADA *E. Coli* SEBAGAI UPAYA PENGEMBANGAN BAHAN
NUTRACEUTICAL KOMERSIAL BERBASIS PROTEIN**

TIM PENGUSUL

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

0010087004

Hardian Susilo Addy, Ph.D

0009118004

dr. Ancha Caesarina Novi Marchiant, Ph.D

0009038206

**UNIVERSITAS JEMBER
2015**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul	: PRODUKSI ARTIFISIAL PEPTIDE ANTIHYPERTENSI MELALUI EKSPRESI GEN Gg- Ah3 PADA E. Coli SEBAGAI UPAYA PENGEMBANGAN BAHAN NUTRACEUTICAL KOMERSIAL BERBASIS PROTEIN
Peneliti/Pelaksana	
Nama Lengkap	: Prof. TRI AGUS SISWOYO SP., M.Agr., Ph.D
Perguruan Tinggi	: Universitas Jember
NIDN	: 0010087004
Jabatan Fungsional	: Guru Besar
Program Studi	: Agronomi
Nomor HP	: 08179607263
Alamat surel (e-mail)	: triagus.faperta@unej.ac.id
Anggota (1)	
Nama Lengkap	: HARDIAN SUSILO ADDY S.P., M.P., Ph.D.
NIDN	: 0009118004
Perguruan Tinggi	: Universitas Jember
Anggota (2)	
Nama Lengkap	: ANCAH CAESARINA NOVI MARCHIANT
NIDN	: 0009038206
Perguruan Tinggi	: Universitas Jember
Institusi Mitra (jika ada)	
Nama Institusi Mitra	: -
Alamat	: -
Penanggung Jawab	: -
Tahun Pelaksanaan	: Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan	: Rp 120.000.000,00
Biaya Keseluruhan	: Rp 583.260.000,00

Mengetahui,
Dekan Fakultas Pertanian

Jember, 9 - 11 - 2015
Ketua,

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

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

PRAKATA

Dengan Mengucap syukur ke hadirat Allah, segala persiapan, pelaksanaan dan penyusunan hasil penelitian kemajuan dengan judul “**PRODUKSI ARTIFISIAL PEPTIDE ANTIHYPERTENSI MELALUI EKSPRESI GEN *Gg-Ah3* PADA *E. Coli* SEBAGAI UPAYA PENGEMBANGAN BAHAN NUTRACEUTICAL KOMERSIAL BERBASIS PROTEIN**” telah dapat kami selesaikan.

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

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

Jember, November 2015

Tim peneliti

Kemajuan Penelitian :

- 1. Pekerjaan penelitian sudah berjalan kurang lebihnya 100 % dari rencana yang dilakukan dalam 1 tahun anggaran**
- 2. Telah mengikuti International Seminar di Surabaya sebagai Oral Presenter (lampiran 1)**
- 3. Telah Submitted Publikasi pada International Journal (Food Chemistry/elsevier) dari sebagian riset yang telah dilakukan (Lampiran 2)**
- 4. Telah dibuat Draf Patent dari sebagian riset yang telah dilakukan (Lampiran 3)**

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	2
PRAKATA.....	3
DAFTAR ISI.....	5
DAFTAR GAMBAR.....	6
DAFTAR TABEL	7
RINGKASAN	8
I. PENDAHULUAN.....	9
II. PETA JALAN RISET DAN TEKNOLOGI.....	13
III. HASIL YANG DIJANJIKAN	16
IV. METODE RISET	17
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	19
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN.....	26
1. International Certificate seminar as Oral Presenter	
2. Submitted Publikasi (Food Chemistry)	
3. Draf Patent	

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Diagram road map penelitian	15
2. HPLC pattern dari PI hidrolisis menggunakan kolum a Cadenza CD-C18.....	19
3. Aktifitas ACE dan ABTS peptida fraksi dari PI-hidrolisis.....	20
4. reHPLC pattern dari PIA3 menggunakan kolum a Cadenza CD-C18	20
5. Aktifitas ACE peptida refraksi dari PI-hidrolisis	21
6. MALDI-TOF MS/MS patten dan analisis berat molekul dan urutan asam amino PI-A35.....	21
7. Hasil sequence DNA putative menggunakan software EMBOSS	22
8. Cloning cDNA Gg-AH3 e.coli DH5 α dengan menggunakan plasmid pBHA. A. Kontruk cDNA Gg-AH3, B. Plasmid pBHA+cDNA Gg-AH3, C. Hasil PCR koloni	22
9. Kontruk cDNA Gg-AH3 pada pET28A, B. Kloning dan PCR koloni.....	23

DAFTAR TABEL

Halaman

RINGKASAN

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

Penggunaan senyawa alami biofungsional protein sebagai nutraceutical merupakan suatu pilihan dikarenakan kespesifikanya dalam fungsi fisiologis. Melalui penelitian sebelumnya (Ristek-SINas 2012-2013 dan Dikti-Stranas 2013-2014) telah ditemukan sumber material antihipertensi dari protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*) berupa peptida yang mampu menghambat aktivitas enzim *Angiotensin-converting enzyme* (*Gg-Ah3*). **Penemuan urutan peptida *Gg-Ah3*** oleh Siswoyo *et al.*, (2014) merupakan penemuan dasar terpenting dalam upaya memproduksi artifisial peptida. Sumber material pengkode gen *Gg-Ah3* inilah, yang dalam usulan penelitian ini dikembangkan ke arah produksi artifisial peptida melalui **teknik kloning gen** pada *E.coli* ke arah komersialisasi bahan nutraceutical yang berbasis protein. Kedepannya kebutuhan akan bahan komersial nutraceutical berupa peptida antihipertensi dapat terpenuhi secara cepat, dan upaya membantu pemerintah dalam pemecahan masalah nasional terutama dibidang kesehatan dalam penyediaan bahan antihipertensi yang aman, murah dan ekonomis dapat terpenuhi.

Dalam hasil penelitian tahun 1 ini telah dilakukan kegiatan sesuai dengan rencana tahun pertama (100%) yaitu 1) telah diturunkannya urutan asam amino *Gg-Ah3* (CMYLASG) ke urutan basa DNA (TGTATGTACCTCGCCTCCGGG), 2) design untuk melakukan sintesa cDNA *Gg-Ah3* pada plasmid pBHA, 3) Kloning gen cDNA *Gg-Ah3* pada plasmid pBHA menggunakan *e.coli* DH5 α dan mengkonfirmasi keberadaan cDNA *Gg-Ah3* menggunakan PCR picking positif colony dengan primer pBA_F/pBH_R, 4) Kloning design vektor cDNA-*Gg-Ah3* ke plasmid ekspresi pET28a konfirmasi hasil cloning menggunakan PCR picking positif colony pada media canamycin dengan primer yang digunakan adalah pBA_F/pBH_R diperoleh band target pada berat molekul yang sangat rendah. Keberhasilan tahun pertama merupakan dasar penting untuk keberlanjutan tahun ke 2.

Kata Kunci: Antihipertensi; Nutraceutical; Peptida *Gg-Ah3*; Biorekator; Kloning gen

BAB 1. PENDAHULUAN

Latar Belakang (Riset yang telah dicapai)

Sumber protein alami dapat diperoleh dari hewan atau tumbuhan. Indonesia kaya akan biodiversitas tumbuhan lokal yang berpotensi sebagai sumber protein fungsional. Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*), banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai penghasil tepung dari biji melinjo. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit dimana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon*) terdiri dari 58% pati, 16.4% lemak, 9-10% protein dan 1% phenolik (Siswoyo, 2004; Siswoyo dan Aldino, 2007). Kandungan protein pada biji yang relatif sangat besar merupakan suatu potensi sebagai sumber protein fungsional alami.

Isolasi dan pemurnian protein biji melinjo telah dilakukan dengan menggunakan teknik kombinasi kolom kromatografi seperti ion exchange dan gel filtration merupakan langkah pertama dalam usaha untuk dapat mengidentifikasi dan mengkarakter potensi aktifitas protein sebagai antioxidant, free radical-scavenging dan antimikrobia. Sebagian besar protein biji melinjo didominasi oleh protein dengan berat molekul sebesar 30 dan 12 kD (Siswoyo *et al.*, 2007, 19th FAOBMB Seoul Conference) berdasarkan analisis menggunakan MALDI-TOF-MS dinyatakan keduanya protein tersebut adalah jenis baru (Siswoyo *et al.*, 2011, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*) dan mempunyai karakter relative lebih stabil pada suhu tinggi jika dikombinasikan dengan NaCl (Siswoyo, 2006, *Jurnal Teknologi & Industri Pangan*, (17) 3:214-220). Selanjutnya, 2 jenis protein hasil pemurnian menunjukkan protein dengan berat molekul 30 kDa mempunyai potensi antioksidan lebih besar daripada protein dengan berat molekul 12 kDa. (Siswoyo *et al.*, 2011, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*). Aktivitas akan meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi protein yang ditambahkan. Aktivitas antioksidan protein ini mempunyai kemampuan yang sama dengan aktifitas BHT pada sistem pengujian emulsi asam linoleic. Dua Jenis protein ini juga menunjukkan potensi sebagai scavenging melawan free radicals seperti DPPH dan superoxide radicals serta kemampuan mereduksi dan mengikat Fe²⁺ dengan kuat. Lebih lanjut penelitian dikembangkan kearah fungsi peptide melalui program *SINas RD-2012-652 dan RD-2013-279* dan telah diketemukan adanya kemampuan sebagai polipeptide antioksidan

(*free radical scavenging*) dan peptide aktif dalam menghambat aktivitas enzim *Angiotensin-converting enzyme* (Siswoyo, 2014, *International seminar APPA, Jeju, Korea, 2014*).

Dengan ditemukannya urutan peptide *Gg-Ah3* dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*) dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan artifisial peptide yang diturunkan dari keragaman gen tanaman asli (lokal) Indonesia. Keanekaragaman protein ini menjadikan pertimbangan sebagai bahan antihipertensi alami yang bisa diaplikasikan di beberapa bidang kesehatan. Kemajuan teknologi di bidang biologi molekular memungkinkan untuk dapat mengembangkan teknik produksi artifisial peptide antihipertensi dengan kemampuan menghambat aktivitas enzim *Angiotensin-converting enzyme* (ACE-inhibitory) melalui transformasi gen pada organisme lain sehingga diperoleh rekombinasi gen yang terekspresi secara alami secara cepat (Tripathi *et al.*, 2004; Ponti *et al.*, 2003). Kedepannya dengan teknologi ini kebutuhan akan bahan komersial nutraceutical yang berbasis protein (peptide antihipertensi) dengan kemampuan yang tinggi dapat terpenuhi secara cepat dan tepat.

State of the art review

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

ketika pasien mengkonsumsi 16-20 jenis obat yang berbeda (Stockley, 1999). Peningkatan *insidensi* efek samping yang jauh melebihi peningkatan obat yang diberikan bersama ini diperkirakan akibat terjadinya interaksi obat yang juga makin meningkat (Setiawati, 1995). Berdasarkan hal-hal tersebut maka diperlukan suatu penelitian yang mencari sumber pengobatan alami yang memanfaatkan sumber local yang dimiliki.

Dalam kurun waktu dua dekade ini para peneliti telah berupaya untuk dapat menemukan protein baru alami yang dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan protein fungsional alami (De Lucca, 2000; Hancock, 2000; Welling *et al.*, 2000; Selitrennikoff, 2001). Keanekaragaman protein fungsional menjadikan suatu pertimbangan dalam menemukan bahan alami yang bisa dimanfaatkan di beberapa bidang (Marshall, 2003). Kemajuan teknologi memungkinkan untuk dapat mengembangkan teknik produksi protein baru melalui rekayasa protein (Wang and Mejia, 2005).

Isolasi dan purifikasi serta penentuan urutan asam amino protein merupakan tahap awal yang harus dikerjakan untuk dapat melakukan karakter dan isolasi gen. Isolasi gen dimulai dengan sintesis fragmen cDNA dengan metode RT-PCR menggunakan primer yang diturunkan dari urutan asam amino seperti yang pernah dilakukan oleh Liu *et al.*, (2000) pada biji pokeweed. Fragmen cDNA selanjutnya digunakan sebagai *probe* DNA untuk isolasi cDNA yang utuh (*full size*) dan isolasi cDNA utuh dilakukan dengan membuat pustaka cDNA dan skrining menggunakan probe fragmen cDNA. Positif klon dari hasil skrining digunakan untuk sequencing penentu sandi genetiknya. Ekspresi DNA (gen) dalam sel bakteri *E. coli* adalah salah satu cara untuk memproduksi protein dalam jumlah besar dan dalam waktu yang singkat (Das, 1990). Keberhasilan dalam ekspresi sangat ditentukan oleh kemampuan untuk dapat tertranskripsi dan tertranslasi, mampu berfusi dengan protein inang, terlindungi dari degradasi oleh protease sel dan tidak mengakibatkan toksid pada sel inang serta stabil agar mudah untuk diisolasi (Haught *et al.*, 1998). Pada plasmid pQE (Qiagen) ini terdapat tag 6xHistidin pada ujung N-terminalnya untuk mempermudah isolasi dan purifikasi protein. Selain itu, pada plasmid ini dilengkapi bagian promoter yang sangat efisien, sehingga DNA yang disisipkan mudah ditranskripsikan dan ditranslasikan (Crowe, 1992). Diperolehnya rekombinan bakteri yang overekspresi dalam memproduksi protein pada bakteri *E. coli* dalam jumlah besar secara cepat, diharapkan dapat mengatasi permasalahan yang ada seperti pemenuhan kebutuhan protein alami.

Perumusan masalah

Penanganan yang sulit akibat dari kompleksnya gejala, komplikasi dan keadaan atau penyakit yang mendasari hipertensi, mengakibatkan penggunaan lebih dari satu macam obat (polifarmasi) secara bersamaan dilakukan. Akan tetapi terjadinya interaksi obat yang berbeda tidak jarang mengakibatkan efek samping yang cukup berbahaya. Upayakan untuk dapat mengurangi atau menghambat dampak negatif tersebut adalah dengan menggunakan senyawa alami. Protein/peptide yang berasal dari tumbuhan asli (lokal) merupakan suatu pilihan sebagai sumber alami. *Gg-Ah3* merupakan peptide antihipertensi hasil isolasi dari biji mlinjo (*Gnetum gnemon*) yang diindikasikan mempunyai potensi aktif menghambat menghambat aktivitas enzim *Angiotensin-converting enzyme* beberapa jenis bakteri gram positif dan negatif (Siswoyo *et al.*, 2014).

Informasi tentang karakter peptide atau DNA pengkode peptide tersebut belum banyak diteliti, upaya untuk mengkaji *Gg-Ah3* perlu dilakukan. Informasi yang lengkap tentang *Gg-Ah3* dapat digunakan sebagai dasar untuk dapat memproduksi artifisial peptide antihipertensi melalui teknik kloning gen dengan mentransformasikan gen *Gg-Ah3* ke bakteri. ***Diperolehnya rekombinan bakteri yang overekspresi dalam memproduksi protein Gg-Ah3 dalam jumlah besar secara cepat, diharapkan dapat mengatasi permasalahan yang ada seperti pemenuhan kebutuhan bahan nutraceutical yang ditujukan untuk mencegah atau menghambat hipertensi yang berbahan dasar protein.***

Tujuan Penelitian

Secara umum penelitian yang diusulkan ditujukan untuk menghasilkan **penemuan baru berupa peptide *Gg-Ah3* dari biji melinjo (*Gnetum gnemon*)**, informasi secara rinci ***kloning gen penyandi peptida antihipertensi (*Gg-Ah3*) dan memperoleh rekombinan bakteri yang overekspresi dalam memproduksi peptida antihipertensi (*Gg-Ah3*)*** dengan teknik kloning gen, dimana teknik ini merupakan inovasi teknologi dibidang molekuler biologi yang kemungkinan produknya dapat di patenkan, disamping itu kemungkinan penerapan produk peptida antihipertensi sebagai bahan nutraceutical komersial yang berbasis protein dan pada produk pangan.

Manfaat dan target riset

Manfaat penelitian ini adalah: 1) Membantu *memecahkan permasalahan nasional terutama dibidang kesehatan dan pangan sehat (nutraceutical)* dalam penyediaan bahan baku komersial alam yang berbasis protein alami dari biji melinjo dan 2) Penyediaan “*paket teknologi*” dalam *menghasilkan dan memperoleh bahan baku aktif berupa peptida*

antihipertensi berbasis protein alami dari biji melinjo secara aman, mudah dan efektif serta ekonomis dengan memanfaatkan potensi kekayaan alami tanaman asli Indonesia.

Target akhir rangkaian penelitian/kegiatan yang dilakukan akan diperoleh bentuk luaran berupa: 1) Diperolehnya rekombinan bakteri yang overekspresi dalam memproduksi protein Gg-Ah3 dalam jumlah besar secara cepat. 2) Teknologi produksi peptida antihipertensi sebagai bahan komersial Nutraceutical menggunakan rekombinan bakteri Gg-Ah3; 2) *Prototipe biorektor dalam memproduksi* peptida antihipertensi 3) Diperoleh material peptida antihipertensi sebagai bahan komersial *Nutraceutical Food Supplement*; 4) Patent/ Intellectual Property Protection; 4) Jurnal Ilmiah Nasional/ Internasional.

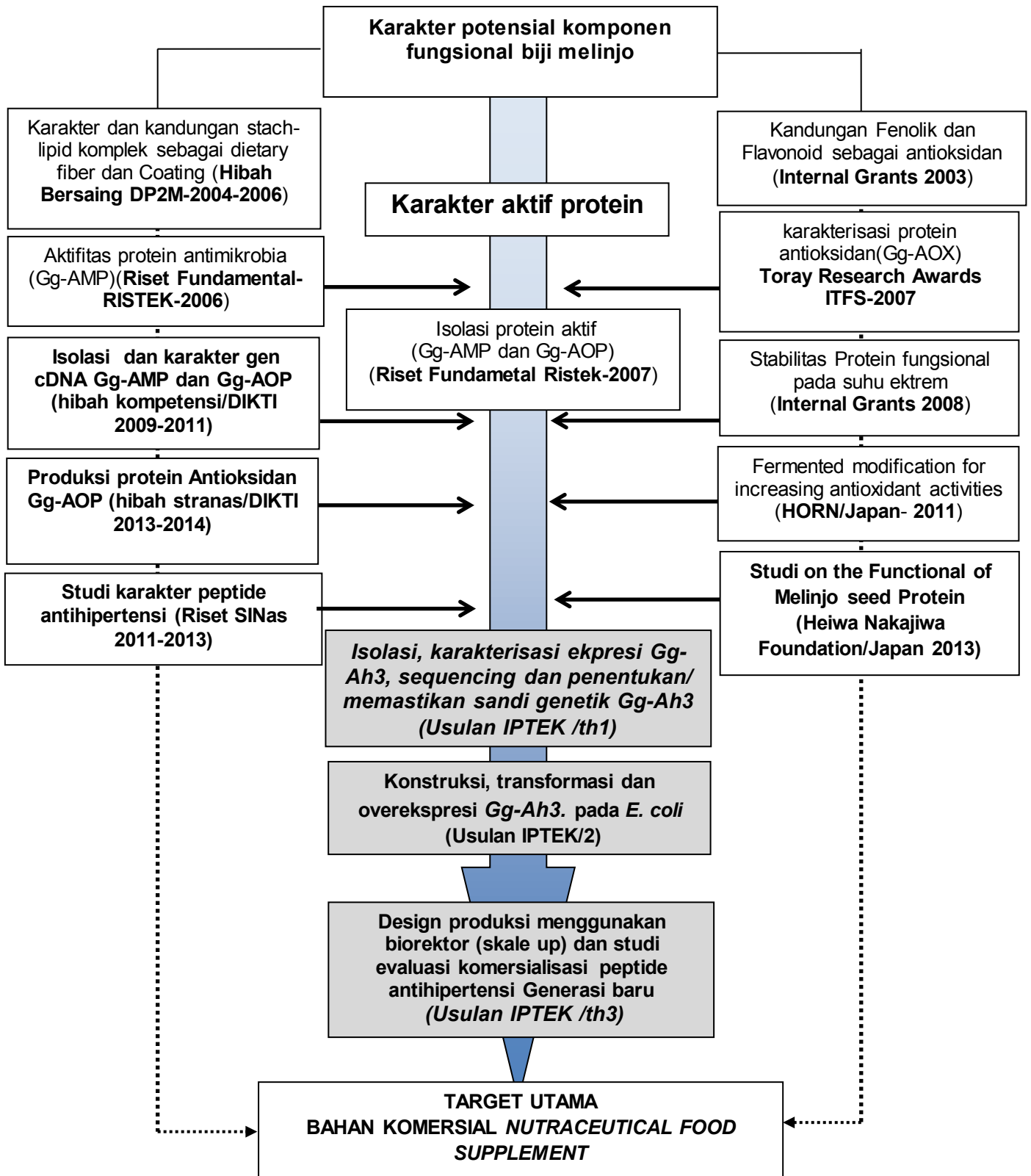
BAB II. PETA JALAN RISET DAN TEKNOLOGI

Potensi aktifitas antioksidan dan total kandungan phenolik pada jaringan tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*) seperti akar, batang, daun, biji dan kulit biji juga dipelajari. Total phenolik pada jaringan sangat bervariasi antara 5.97 and 9.91 mg GAE g⁻¹, sedangkan kandungan flavonoik antara 0.85 – 3.14 mg QE g⁻¹. Tingginya aktivitas radical scavenging ditemukan pada jaringan akar dengan kisaran 37.27 mg VCEAC g⁻¹ sampel. Lebih lanjut, tingkatan aktifitas radical scavenging pada beberapa jenis jaringan sebagai berikut: akar (37.27 mg VCEAC) >daun (36.66 mg VCEAC) > biji (34.08 mg VCEAC)> batang (32.52 mg VCEAC)>kulit biji (32.48 mg VCEAC). Kandungan phenolik/flavonoik yang tinggi mengindikasikan adanya potensi tinggi sebagai radical scavenging (*Siswoyo and Aldino, 2007, International Conference on Chemical Sciences/ICCC, 2007*).

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

Chemistry). Aktivitas akan meningkat seiring dengan penambahan konsentrasi protein yang ditambahkan. Aktivitas antioksidan protein ini mempunyai kemampuan yang sama dengan aktifitas BHT pada sistem pengujian emulsi asam linoleic. Dua Jenis protein ini juga menunjukkan potensi sebagai scavenging melawan free radicals seperti DPPH dan superoxide radicals serta kemampuan mereduksi dan mengikat Fe^{2+} dengan kuat. Dari data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa protein biji melinjo sangat berpotensi sebagai sumber antioxidant (*Siswoyo, 2007, Toray Research Awards, ITSF; Siswoyo et al., 2011, Journal of Agricultural and Food Chemistry*). Teknik isolasi protein antioksidan masih dalam perolehan *Patent (sederhana)* dengan no. *Publikasi 2013/01666 A* an. peneliti up. universitas Jember. Lebih lanjut, pengujian potensi protein biji melinjo sebagai antibakteri dan antifungal juga dilakukan. Pengujian dengan menggunakan disk diffusion dan pengukuran turbidity menunjukkan protein biji melinjo sangat efektif menghambat beberapa jenis jamur dan bakteri baik gram negative atau positif seperti *Bacillus subtilis, Bacillus cereus Escherichia coli and Salmonella thypi* (*International Seminar Advance in Biological Science, 2007*). Hasil penelitian sebelumnya (*SINas RD-2012-652 dan RD-2013-279*) telah diketemukan adanya kemampuan sebagai polipeptide antioksidan (*free radical scavenging*) dan peptide aktif dalam menghambat aktivitas enzim *Angeotinsin-converting enzyme* (ACE) (*Siswoyo, 2014, International seminar APPA, Jeju, Korea, 2014*). Informasi yang lengkap tentang urutan peptide *Gg-Ah3* dapat digunakan sebagai dasar untuk dapat memproduksi artifisial peptide antihipertensi melalui teknik kloning gen dengan mentransformasikan gen *Gg-Ah3* ke bakteri.

Dari informasi penting yang diperoleh dalam rangkaian kegiatan penelitian sebelumnya tentang potensi yang dimiliki oleh protein/peptide dari biji melinjo sebagai sumber bahan nutraceutical komersial berbasis protein. maka tujuan utama penelitian penelitian ini untuk ***diperolehnya rekombinan bakteri yang overekspresi dalam memproduksi protein Gg-Ah3 dalam jumlah besar secara cepat, diharapkan dapat mengatasi permasalahan yang ada seperti pemenuhan kebutuhan bahan nutraceutical yang ditujukan untuk mencegah atau menghambat hipertensi yang berbahan dasar protein.*** Inovasi teknologi produksi secara kloning gen dan hasil produknya ini kemungkinan dapat diterapkan sebagai bahan *nutraceutical Food Supplement* dalam pencegahan hipertensi atau sebagai protein fungsional pada produk pangan. Hal tersebut penting artinya untuk melakukan produksi protein fungsional/ peptide antihipertensi generasi baru sebagai bahan dasar pembuatan *nutraceutical food supplement* secara alami dan cepat (**Gambar 1**).



Gambar 1. Diagram Peta Jalan Penelitian

BAB 3. HASIL YANG DIJANJIKAN

Target luaran secara umum yang diharapkan dan capaian luaran yang akan diperoleh pada penelitian ini adalah 1) Diperolehnya rekombinan bakteri yang overekspresi dalam memproduksi protein *Gg-Ah3* dalam jumlah besar secara cepat. 2) Teknologi produksi peptida antihipertensi sebagai bahan komersial Nutraceutical menggunakan rekombinan bakteri *Gg-Ah3*; 3) Prototipe biorektor dalam memproduksi peptida antihipertensi; 4) Diperoleh material peptida antihipertensi sebagai bahan komersial *Nutraceutical Food Supplement*; 5) Patent/ Intellectual Property Protection; 6) Jurnal Ilmiah Nasional/ Internasional. Secara rinci untuk tiap tahunannya sbb:

Target luaran Tahun 1 (2015):

- 1) Urutan peptida *Gg-Ah3* (*bln ke 3*);
- 2) Diperoleh cDNA-*Gg-Ah3* dan hasil konfirmasi urutan gen *Gg-Ah3* (*bln ke 5-6*);
- 3) Karakter gen pencode *Gg-Ah3* (*bln ke 8-10*);

Target luaran Tahun II (2016):

- 1) Konstruksi peptida *Gg-Ah3* pada Plasmid (*bln ke 3*);
- 2) Transforman *E.coli* yang sudah terinsert gen *Gg-Ah3* (*bln ke 5-6*);
- 3) Karakter ekspresi gen *Gg-Ah3* pada bakteri transforman (*bln ke 8-10*);
- 4) Penulisan draf paten, seminar dan publikasi (*bln ke 6-10*).

Target luaran Tahun III (2017):

- 1) Kondisi optimal hasil design bioreactor dalam produk peptida *Gg-Ah3* (*bln ke 2*);
- 2) Model prototipe produksi peptide aktif antihypertensi pada skala besar (*bln ke 4-6*);
- 3) Peptida aktif antihypertensi dan model komersialisasi produk (*bln ke 7-8*);
- 4) Publikasi Ilmiah berupa seminar, HKI dan jurnal terakreditasi nasional/international (*bln ke 8-10*).

BAB 4. METODE Riset

Tahun I. Isolasi dan Karakter gen *Gg-Ah3*

Isolasi mRNA Total RNA diisolasi dari sample biji yang digunakan menggunakan metoda ekstraksi *guanidium-thiocyanate* yang diikuti dengan centrifugasi dalam gradient Cesium chloride (Sambrook *et al.*, 1989). Setelah didapat total RNA, diisolasi mRNA menggunakan kolom afinitas Oligo-dT.

RT-PCR Menggunakan reverse-transcriptase yang dikombinasikan dengan polimerase dan primer (*forward* dan *reverse primers*) yang didesign dari sequence asam amino *Gg-Ah3*, fragmen cDNA-*Gg-Ah3* dapat disintesis dengan alat PCR. Fragmen cDNA yang didapat kemudian diklonkan pada vektor yang sesuai (pGEM-T vector). Sesudah penentuan sandi genetik fragmen cDNA-*Gg-Ah3* melalui sequencing, maka dapat disimpulkan apakah fragmen DNA tersebut adalah yang dimaksudkan (DNA-*Gg-Ah3*). Selanjutnya fragmen cDNA-*Gg-Ah3* dapat digunakan sebagai *probe* DNA analisis berikutnya. Pustaka cDNA dapat dikonstruksi menggunakan Kit yang tersedia (TimeSaver cDNA synthesis Kit- Pharnacia). Pada prinsipnya metode tersebut menggunakan mRNA yang telah dirubah menjadi cDNA, kemudian dikonstruksi menggunakan lambda vektor yang sesuai (lambda Ziplox System- Gibca BRL). Selanjutnya dilakukan uji titer pustaka cDNA. Apabila titernya cukup tinggi untuk dilakukan skrining dengan probe cDNA- *Gg-Ah3*. Sequencing positif klon cDNA dilakukan menggunakan DNA-sequencer.

Analisis karakter gen *Gg-Ah3*. Analisis Northern Blotting dilakukan untuk melihat ekspresi gen *Gg-Ah3* pada biji mlinjo. Analisa Northern Blot, RNA diisolasi menggunakan metode yang disebutkan diatas, kemudian dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1.2% pada kondisi denaturasi menggunakan bufer yang mengandung Formaldehyde/ Formamide. RNA yang sudah dielektroforesis ditransfer pada membran Nitrocellulose Hybond N⁺. Sesudah dibridisasi dengan *probe* cDNA-*Gg-Ah3* visualisasi signal dilakukan menggunakan chemiluminescence Kit. Dilanjutkan dengan melakukan karakter ekspresi gen *Gg-Ah3* menggunakan qPCR dimana primer didesign berdasarkan fragmen dari urutan peptide yang telah diturunkan ke DNA dengan panjang fragmen antara 8-10 base

Isolasi ACE inhibitor Peptides

Protein 5% (b/ v) larutan isolat disiapkan dan dihidrolisis dengan protease selama 0 - 6 jam,

hidrolisis dihentikan oleh perlakuan panas pada suhu 90°C selama 10 menit. Hidrolisat telah diklarifikasi oleh pemusingan pada 3000 rpm selama 20 menit untuk menghilangkan fragmen substrat larut dan enzim sisa. Para hidrolisat kemudian beku, lyophilized dan disimpan pada suhu 20°C sebelum analisis lebih lanjut.

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan asam trinitrobenzenesulphonic (TNBS) (Alder-Nissen, 1979), dan prosedur ini diadopsi dari Thiansilakul et al., (2007). Asam α -amino Jumlah ditentukan dalam sampel di hidrolisis secara asam (6 M HCl pada 100°C selama 24 jam) dan asam α -amino larut diukur pada awal dan akhir enzimatik reaksi. Sampel (125 μ L) dicampur dengan 2,0 ml buffer 200 mM fosfat pH 8,2 dan 1,0 mL larutan 0,1% TNBS. Campuran vortexed selama 1 menit, ditutupi dengan aluminium foil dan dipanaskan pada suhu 50°C selama 30 menit. Sodium sulfit (0,1 M, 2.0 mL) ditambahkan ke campuran untuk melengkapi reaksi. Campuran ini kemudian didinginkan pada suhu kamar selama 15 menit. Absorbansi campuran kekuningan kemudian ditentukan pada 420 nm dan kuantifikasi asam α -amino dilakukan menggunakan larutan standar L-leusin. Derajat hidrolisis ditentukan sebagai berikut: $DH (\%) = [(Lt-Lo) / Lmax-Lo] \times 100$, mana Lt adalah jumlah asam α -amino dirilis pada waktu t; Lo adalah jumlah amino bebas asam pada protein asli terpenencil; Lmax adalah asam amino total protein asli terisolasi diperoleh setelah hidrolisis asam.

Kemampuan aktivitas ACE inhibitor menggunakan metode yang disebutkan dalam Technical Manual ACE kit-WST dan peredaman radikal bebas (*free radical scavenging*) menggunakan metode Oktay (Oktay et al.,2003). Protein berbagai konsentrasi (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 dan 100 μ g) ditambahkan larutan 0,01mM DPPH sampai 1 mL. Sebagai standar antioksidan digunakan G-SH (kontrol positif). Setiap sampel dilakukan tiga ulangan (replikasi). Larutan tersebut kemudian diinkubasi selama 30 menit dan di analisis pada panjang gelombang 517 nm. Kemampuan radikal DPPH dihitung menggunakan rumus sebagai berikut : $PPH \text{ scavenging effect } (\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$, dimana : A_0 = Absorbansi blanko (0.1mM larutan DPPH); A_1 = Absorbansi sampel (larutan sampel + 0.1mM larutan DPPH).

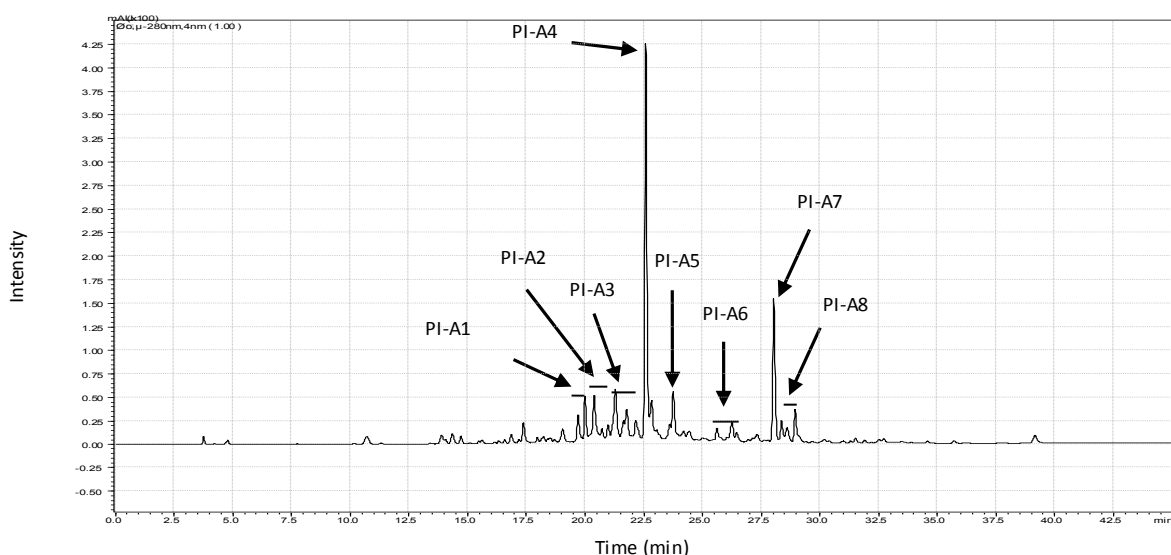
HPLC Analisis Perubahan atau distribusi berat molekular protein setelah dan sesudah dihidrolisis diamati menggunakan HPLC dengan kolom Cadenza CD-C18 150x46 mm dengan gradient kosentrasi larutan A: 5% CH₃CN (1% TFA) dan larutan B: 90% CH₃CN (0.07% TFA), kecepatan larutan 0.5 ml/min, kondisi kolom pada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

MALDI-TOF-MS. Penentuan berat molekul dan urutan peptide dilakukan dengan menggunakan prosedur yang disebutkan dalam operasional alat MALDI TOF-MS (Voyager STR, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA). Analisis sampel dilakukan menggunakan Voyager-DE STR MALDI-TOF mass spectrometer dengan parameter pengukuran ion masses perbandingan reflection/delayed ekstraksi mode dengan accelerating voltage of 20 kV, grid voltage 76%. Data diproses menggunakan MoverZ (<http://bioinformatics.genomicsolutions.com>) software.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

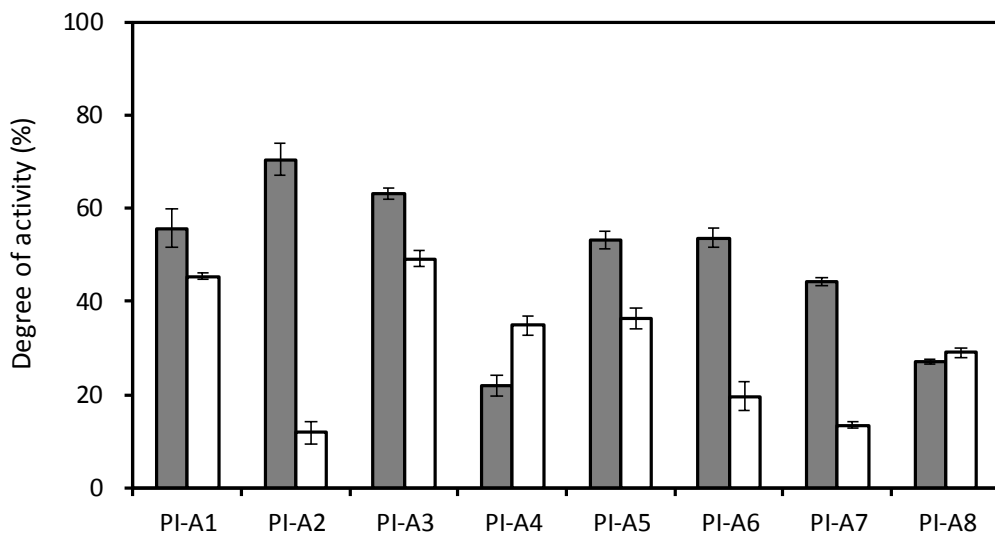
Purifikasi dan identifikasi peptide penghambat ACE

Pemurnian peptide dengan aktifitas ACE tinggi dari peptide hasil hidrolisis PI menggunakan alcalase dilakukan dengan kolom kromatografi Cadenza CD-C18 dengan mengkombinasikan secara preparatif dan analisis. Pada tahap pertama pemisahan dengan menggunakan HPLC preparative diperoleh pemisahan beberapa jenis peptide menjadi 8 fraksi (PI-A1-8) berdasarkan puncak yang diperoleh pada ABS 280nm dan setiap puncak yang diperoleh di analisis aktifitas penghambat ACE. Pada Gambar 2 pemisahan antar peptide terlihat jelas dan diperoleh suatu puncak dominan pada RT 22.5 min.



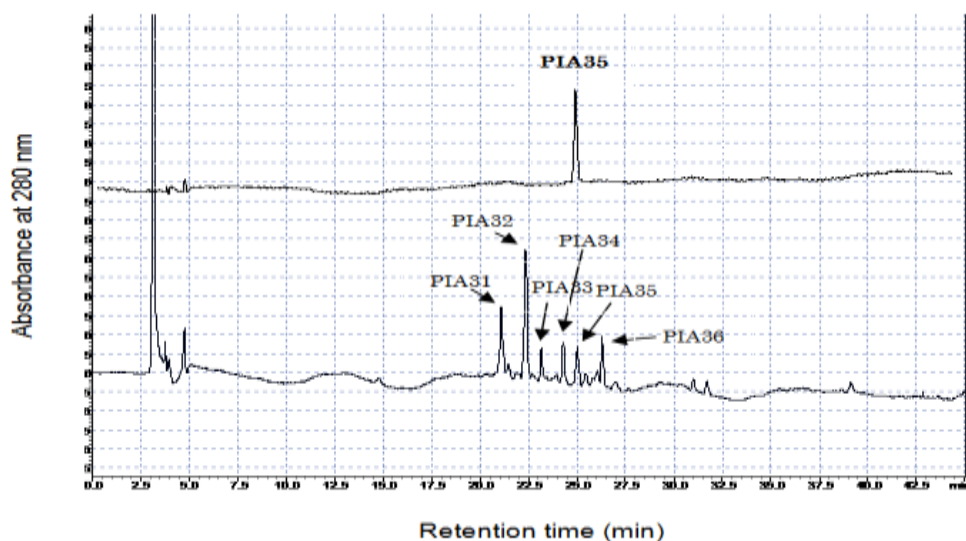
Gambar 2. HPLC pattern dari PI hidrolisis menggunakan kolom a Cadenza CD-C18.

Pengujian aktifitas penghambatan ACE pada tiap fraksi yang diperoleh aktivitas tertinggi dengan kombinasi aktivitas ABTSnya terlihat pada fraksi PI-A3 dengan hambatan berturut-turut 70 dan 56% (Gambar 3).

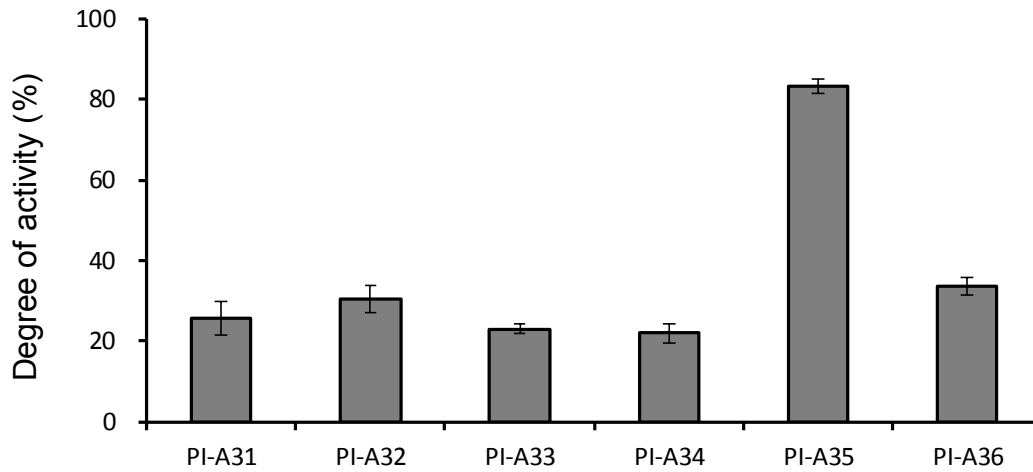


Gambar 3. Aktifitas ACE dan ABTS peptida fraksi dari PI-hydrolysis

Fraksi PI-A3 menjadi bahan untuk murnikan lagi menggunakan HPLC analitik untuk memperoleh peptide aktif yang murni. Pada tahapan lanjut setelah dilakukan pemisahan terdapat beberapa jenis peptide dengan puncak sebanyak 6 dan menjadikan fraksi PIA31-6.

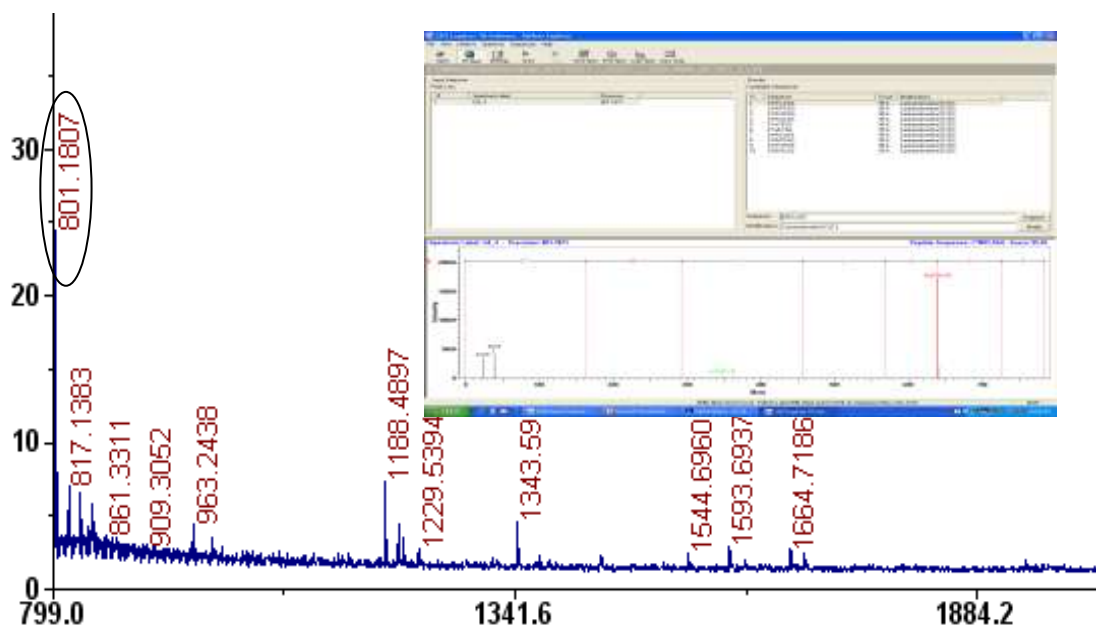


Gambar 4. reHPLC pattern dari PIA3 menggunakan kolom a Cadenza CD-C18.



Gambar 5. Aktifitas ACE peptida refraksi dari PI-hidrolisis

Pengujian aktifitas penghambatan ACE pada tiap fraksi yang diperoleh aktivitas tertinggi pada fraksi PI-A36 (Gambar 4) dengan hambatan sebesar 80% (Gambar 5). Analisis peptide PI-A36 isolate diteruskan dengan penentuan berat molekul peptide dan urutan asam amino pembentuknya. Menggunakan MADI-TOF MS/MS diperoleh berat molekul peptide tersebut sebesar 801.1 Dalton dengan urutan CMYLASG seperti terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. MALDI-TOF MS/MS patten dan analisis berat molekul dan urutan asam amino PI-A35

Identifikasi dan Sintetik DNA Gg-AH3

Dari hasil MALDI TOF-MS telah diperoleh urutan peptide Gg-AH3 sebagai berikut CMYLASG melalui analisis menggunakan software (Gambar 7) diperoleh urutan DNA sebagai berikut TGTATGTACCTCGCCTCCGGG panjang 21 bp dengan GC content sebesar 62%



Gene alignment report (1 / 1)

Date : 2015. 7

Template : Sequence_1

temp	TGTATGTACCTCGCCTCCGGG	21
temp-pBA_F	AGACAGCGATTGTATGTACCTCGCCTCCGGGATCATGTAGT	41
consensus	-----	

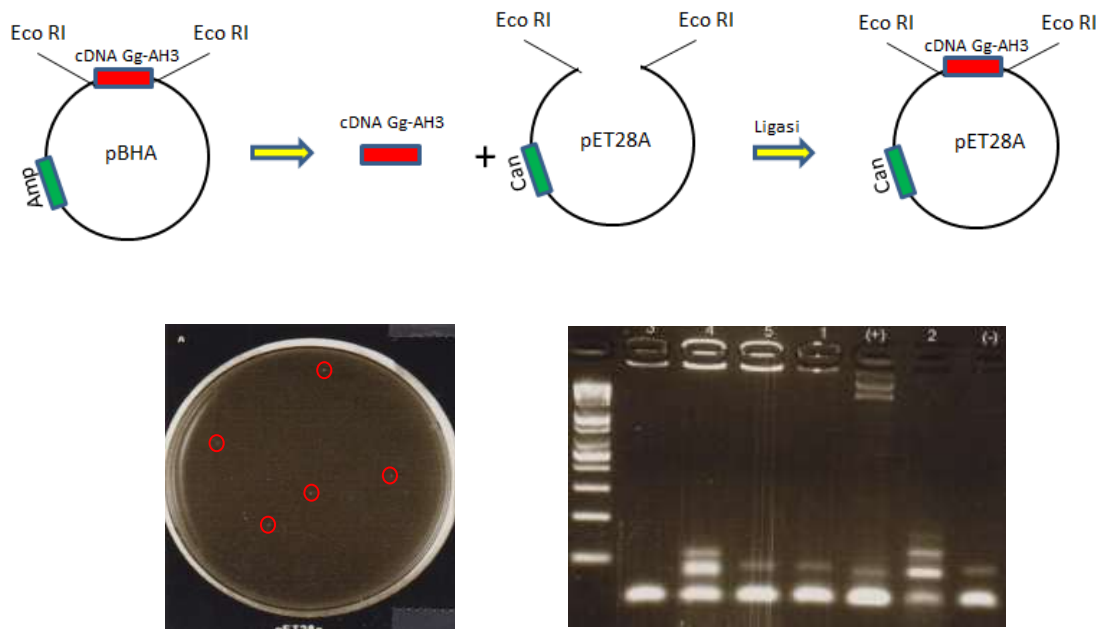
Gambar 7. Hasil sequence DNA putative menggunakan software EMBOSS (A); alignment gene (B).

Kloning cDNA Gg-AH3 sintetik dengan menggunakan sequence hasil yang disebutkan sebelumnya pada plasmid pBHA vektor dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Cloning cDNA Gg-AH3 *e.coli* DH5 α dengan menggunakan plasmid pBHA. A. Kontruk cDNA Gg-AH3, B. Plasmid pBHA+cDNA Gg-AH3, C. Hasil PCR koloni

Dari hasil kloning sebelum dilakukan konfirmasi dengan melakukan isolasi plasmid hasil cloning diperoleh berat molekul cDNA Gg-AH3 dengan plasmid pembawa lebihnya 2000 bp artinya gen target telah terinteraksi pada plasmid, akan tetapi untuk mengkonfirmasi kita lakukan analisis menggunakan PCR koloni dengan menggunakan primer yang didesign berdasarkan sebagian sequence dari plasmid pBA- forward AGACAGCGATTGTATGTA dan untuk pBA-R ACTACATGATCCCCGGAGG dan diperoleh cDNA product dengan berat molekul sangat rendah (Gambar 8C.).



Gambar 9. A. Kontruk cDNA Gg-AH3 pada pET28A, B. Kloning dan PCR koloni

Untuk selanjutnya dilakukan crossing kloning dengan melakukan pemindahan cDNA hasil cloning pada pBHA ke plasmid pET28A yang merupakan plasmid ekspresi. Tahapan dalam cloning bisa dilihat pada Gambar 9A. Setelah proses ligasi antara gen target (cDNA Gg-AH3) ke pET28A dilakukan cloning pada bakteri e.coli DH5 α yang ditumbuhkan pada media yang mengandung kanamycin. Tumbuhnya beberapa koloni bakteri tranforman pada Gambar 9B menunjukkan indikasi adanya bakteri yang mengandung plasmid pembawa. Dari hasil kloning dilakukan konfirmasi dengan melakukan analisis PCR koloni dengan menggunakan primer yang didesign berdasarkan sebagian sequence dari plasmid pBA-forward AGACAGCGATTGTATGTA dan untuk pBA-R ACTACATGATCCCCGGAGG dan diperoleh cDNA product dengan berat molekul sangat rendah (Gambar 9B.). untuk selanjutnya akan dilakukan sequence dari cDNA produk untuk meyakinkan kebenaran sequence cDNA target.

Daftar pustaka

- Ahmadi, F.; Kadivar, M.; Shahedi M. Antioxidant activity of *Kellussia ordoratisissima* Mozaff in model and food system. *Food Chem.* **2007**, 105, 57-64.
- Coice L.N, A.E. Frissen, D.J., Van Zoelen, I.F Eggent, F. Peter, C.M. Davidescu and C.G. Boeriu. World academy of Science, Engineering and Technology, 2011, 52, 361-366.
- Dinis, T. C. P.; Madeira, V. M. C.; Almeida, L. M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, 315, 161-169.
- Je, J., Lee, K., Lee, M.H., Ahn, C. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res. Inter.*, **2009**, 9, 1266-1272
- Kouoh, F.; Gressier, B.; Luyckx, M.; Brunet, C.; Dine, T.; Cazin, M. Antioxidant properties of albumin: Effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes. *Il Farmaco*, **1999**, 54,695–699.
- Krishnaiah, D; Sarbatly, R.; Bono, A. Phytochemical antioxidants for health and medicine-A move towards nature. *Biotech. Mol. Bio. Rev.* **2007**, 2, 097-104
- Laurent B and Loubna F. Membrane Processes and Devices for Separation of Bioactive Peptides. Recent Patent on Biotechnology. 2009, 3, 61-72.
- Mikulikova, L.; Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J. Biomed. Sci.* **2001**, 8, 59–70.
- Mitsuda, H.; Yasumoto, K.; Iwami, K. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyoto Shokuryo*, **1996**, 19, 210-214.
- Sian, B.A. Dietary antioxidants-past, present and future? *Trends in Food Sci. Technol.* **2003**, 14, 93-98.
- Siswoyo, T.A. Effect of Sodium Chloride on Thermal Properties of a 30 kDa Protein Isolated from Melinjo Seed. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **2006**, Vol.17, No.3,214-220.
- Siswoyo,T.A., Oktiviandari, P and Sugiharto, B (2007) Isolation and Characterization of free Radical Scavenging Activities Polypeptides from the Melinjo Seed (*Gnetum gnemon*). *International Conference of FAOMBM. Seoul, Republic of Korea*
- Siswoyo, T.A and Aldino, M (2007) Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content of Mlinjo Tree (*Gnetum gnemon* L.). *International Conference of Chemistry Science*, UGM, Yogyakarta.
- Siswoyo, T.A and Yoga A.B. (2007) Isolation of Antimicrobial Polipeptide from the Melinjo Seed (*Gnetum gnemon*). *Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*, Bandung.
- Siswoyo, T.A., Aldino, M., Wahdyah N dan Okviandari P., (2007) Isolasi Protein Antioksidan Dari Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) *Perhimpunan Ahli Teknologi Pangan Indonesia (PATPI)*, Bandung.
- Siswoyo,T.A., Yoga A., Ardyati, T and Sugiharto, B (2007) Isolation and Characterization of Plant Antibacterial Polipeptide from Melinjo Seed (*Gnetum gnemon*). *International Seminar Advances in Biological Science*. UGM, Yogyakarta.
- Siswoyo, T.A., Eka M., Lee K.O. and Hosokawa K. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions From Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seed. *J. Agricultural and Food chemistry.* **2011**, 10:5648-5656.

- Sivonova, M.; Tatarkova, Z.; Durackova, Z., Dobrota, D.; Lehotsky, J.; Matakova, T. Kaplan, P. Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged rats. *Physiol. Res.* **2007**, 56, 757-764.
- Smith, M. A.; Perry, G.; Richey, P. L.; Sayre, L. M.; Anderson, V. E.; Beal, M. F.; Kowal, N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature*, **1996**, 382, 120-121.
- Tang X.; He Z.; Dai Y.; Xiong Y.L.; Xie M.; Chen J. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. *J. Agri. Food Chem.* **2010**, 58, 587-593.
- Wang, W.; Mejia, E.G. A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases. *Com. Rev. in Food Sci. and Food Safety* 2005. 4, 63-78.
- You L.; Zhao M.; Regenstein J. M.; Ren J. Change in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus angui licaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2010**, 120, 810-816
- Zhao, L.; Zhao, G.; Hui, B.; Zhao, Z.; Tong, J.; Hu, X. Effect of selenium on increasing the antioxidant activity of protein extracts from a selenium-enriched mushroom species of the *Genoderma* Genus. *J. Food Sci.* **2004**, 69, 184-188.
- Zhu, L.J.; Chen, J.; Tang, X. Y.; Xiong, Y.L. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digest of alcalase-treated zein hydrolysate. *J. Agri. Food Chem.* **2008**, 56, 2714-2721.

Lampiran 1. International Certificate seminar as Oral Presenter



Lampiran 2. Submitted Publikasi (Food Chemistry)

Chemistry Elsevier Editorial System(tm) for Food
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Fermentation-induced Changes on Antioxidant Activities and Oxidative DNA Damage Preventive of Melinjo (*Gnetum gnetum*) Flour

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: Fermented; Melinjo; *Lactobacillus fermentum*; Antioxidant; DNA Damage

Corresponding Author: Prof. Tri Agus Siswoyo, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Center of Development Advanced Sciences and Technology, University of Jember

First Author: Tri Agus Siswoyo, Ph.D

Order of Authors: Tri Agus Siswoyo, Ph.D

Abstract: The antioxidant capacity of fermented melinjo flour (FMF) was investigated in order to find out their nutraceutical potential, and unfermented melinjo flour (UMF) was used as a control. Fermented melinjo flour was prepared using *Lactobacillus fermentum* starter. The effects of fermentation on melinjo flour in terms of total phenolic content (TPC), antioxidant as an activities and DNA damage protection were investigated. The antioxidant activities of FMF and UMF were determined by different standard methods. The result revealed that fermented had significantly ($p < 0.05$) higher phenolic content (10.61 mg GAE/g) than the unfermented (8.61 mg GAE/g). Using HPLC-DAD detection showed that fermentation resulted in loss of phenolic compounds such kind gnetifolin E, gnetinoside (A or B) and resveratrol but not for gnetin C. Subsequently, fermentation caused a significant ($p < 0.05$) increase in the DPPH, ABTS radical scavenging ability, OH and reducing property. Additionally, FMF extract exhibited greater protection against oxidative DNA damage induced by Fenton's reagent. The results suggested that FMF with enhanced antioxidant capacity could provide a functional melinjo flour to contribute to the health and nutritional status improvement of consumers.

Keywords: Fermented, Melinjo, *Lactobacillus fermentum*, Antioxidant, DNA Damage

Original Research Paper

Fermentation-induced Changes on Antioxidant Activities and Oxidative DNA Damage Preventive of Melinjo (*Gnetum gnemon*) Flour

Tri Agus SISWOYO^{1*}, Tri Ardyati², Keizo Hosokawa³

¹Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST) and Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Jember, Indonesia.

²Department of Biology, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, University of Brawijaya, Indonesia.

³Department of Nutritional Management, Faculty of Health Sciences, University of Hyogo, Kakogawa 675-0195, Japan.

*Corresponding AUTHOR

Tri Agus SISWOYO, Ph.D

Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)

University of Jember

Jln. Kalimantan 37 Kampus Tegalboto, Jember 68121, East Java, Indonesia

Telp./ Fax : +62-331-321825

e-mail : siswoyo.triagus@gmail.com or triagus.faperta@unej.ac.id

ABSTRACT

The antioxidant capacity of fermented melinjo flour (FMF) was investigated in order to find out their nutraceutical potential, and unfermented melinjo flour (UMF) was used as a control. Fermented melinjo flour was prepared using *Lactobacillus fermentum* starter. The effects of fermentation on melinjo flour in terms of total phenolic content (TPC), antioxidant activities and DNA damage protection were investigated. The antioxidant activities of FMF and UMF were determined by different standard methods. The result revealed that fermented had significantly ($p < 0.05$) higher phenolic content (10.61 mg GAE/g) than the unfermented (8.61 mg GAE/g). Using HPLC-DAD detection showed that fermentation resulted in loss of phenolic compounds such kind gnetifolin E, gnemonoside (A or B) and resveratrol but not for gnetin C. Subsequently, fermentation caused a significant ($p < 0.05$) increase in the DPPH, ABTS radical scavenging ability, OH and reducing property. Additionally, FMF extract exhibited greater protection against oxidative DNA damage induced by Fenton's reagent. The results suggested that FMF with enhanced antioxidant capacity could provide a functional melinjo flour to contribute to the health and nutritional status improvement of consumers.

Keywords: Fermented, Melinjo, *Lactobacillus fermentum*, Antioxidant, DNA Damage

1. Introduction

Although synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA) and tert-butylhydroquinone (TBHQ), as well as propyl gallate (PG), have widely been used in retarding lipid oxidation, their safety has recently been questioned due to toxicity and possible carcinogenicity (Shahidi, 2000). Thus, development of safer natural antioxidants from extracts of plant materials that can replace synthetic antioxidants has been of interest (Tepe, Sokmen, Askin & Sokmen, 2004; Dastmalchi, Damien, Kosar & Hiltunen, 2007; Tepe & Sokmen, 2007; Siswoyo, Mardiana, Lee, & Hoshokawa, 2013). Food antioxidants such as amino acids, peptides, proteins, flavonoids and other phenolic compounds might play a significant role as physiological and dietary antioxidants, thereby augmenting the body's natural resistance to oxidative damage (Shahidi, 2000).

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) belongs to the family Gnetaceae, native to Indonesia. The tree is small to medium in size, 15–20m tall, with evergreen leaves. The fruit-like strobilus consists of little skin and a large nut-like seed that is 2-4 cm long inside, with both the fruits and leaves being very popular in Indonesian cuisines. Kato, Tokunaga, and Sakan (2009) found that melinjo seed extract contains various stilbenoids including *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene), gnetin C (GC; resveratrol dimer), gnetin L (GC derivative), gnemonoside A (GC diglucoside), gnemonoside C (GC-monoglucoside), and gnemonoside D (GC-monoglucoside). These derivatives are collectively referred to as "Melinjo resveratrol." Recently, *trans*-resveratrol has attracted considerable attention because it extended the lifespan of mice that were fed a high-calorie diet (Baur, Pearson, & Price, 2006). Moreover, human studies indicated that *trans*-resveratrol is beneficial in the management of diabetes (Brasnyó, Molnár, & Mohás, 2011) and cardiovascular diseases (Wong *et*

al., 2011). However, several *in vitro* studies on the resveratrol derivatives in melinjo seed extract revealed its nutraceutical effects such as the inhibition of lipase and amylase, antibacterial properties (Kato, Tokunaga, & Sakan, 2009), inhibition of angiogenesis (Kunimasa, Ohta, & Tani, 2011), and immunostimulatory effects (Kato, Samizo, Kawabata, Takano, & Ohta, 2011).

Throughout history, fermentation has been used to improve product properties. Previous studies have shown that microorganisms start to modify plant constituents during fermentation (Katina *et al.*, 2007). Many biochemical changes occur during fermentation, leading to altered ratio of nutritive and antinutritive components of plants, which affect product properties such as bioactivity and digestibility (Heiniö *et al.*, 2003; Katina *et al.*, 2007). Therefore the objective of this work was to assay the influence of fermentation using *Lactobacillus fermentum* on antioxidative activity and oxidative DNA damage protection of melinjo flour.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The melinjo (*Gnetum gnemon*) seeds used in this study collected during January-February 2013, the plants from the collection of the Faculty of Agriculture, University of Jember, East of Java, Indonesia. The compounds 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), thiobarbituric acid (TBA) and gallic acid (GA) were purchased from Sigma–Aldrich, Folin–Ciocalteu reagent was purchased from Merck & Co., Inc. (New York, USA), and all other chemicals and solvents were the highest commercial grades purchased from Wako and Fluka (Japan). Microorganisms used in this study (*Lactobacillus fermentum*) was from a collection of the Laboratory of Microbiology of

the Faculty of Natural Sciences, University of Brawijaya, Indonesia. The MRS broth growth media was purchased from Merck & Co., Inc. (New York, USA).

2.2. Preparation of cultures

Stock cultures of the lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* was grown and maintained on MRS agar (Difco, Detroit, MI, USA). Cultures were transferred from slants to MRS broth (Difco) and incubated for 24 h at 37°C. The cells were washed twice with sterile saline solution (0.8% NaCl) and used as inoculum.

2.3. Preparation of melinjo flour

Melinjo seeds were washed three times with sterile distilled water under aseptic conditions and dried at 50°C for 24 h. After drying, samples were ground in a stainless steel blender (New Hartford, Conn, USA), sieved and the 0.050–0.250 mm fraction was collected. Melinjo flour fermentation at the fermentor scale was carried out by suspending 300 g of flour in 1 L of sterile distilled water prepared aseptically. These suspensions were fermented using inoculated with a 10% (v/v) inoculum representing 10^8 cells mL⁻¹ of *Lactobacillus fermentum* at 37°C for 48 h, in a 1 L stirred fermentor at 450 rpm. After fermentation the samples were freeze-dried as a whole.

2.4. Extraction of phenolic compounds

The samples (1 gr of FMF and UMF) were pulverized into fine powder using a stainless steel blender (New Hartford, Conn, USA). The meal was extracted twice by 5 mL of 50% methanol, under reflux, for 60 min periods. The methanol extract was filtered through on a 0.45 µm filter (Gelman GHP) for the determination of the

antioxidant activities, the total content of phenolic, antioxidant activities, HPLC analysis and assessment of DNA damage.

2.5. Determination of total phenolics content

The concentration of phenolic compounds was measured according to the method of Taga, Miller, and Pratt (1984) and calculated using gallic acid as standard. The resulting solution (100 μ L) was added to 2 ml of 2% Na_2CO_3 . After 2 min, 50% Folin-Ciocalteu reagent (100 μ L) was added to the mixture, which was then left for 30 min. Absorbance was measured at 750nm using a spectrophotometer. Results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents (GAE) per gram sample.

2.6. HPLC Analysis

High performance liquid chromatography was performed with a Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) equipped with Shimadzu LC-20AT (Shimadzu, Kyoto, Japan) reciprocating pumps connected to a DGU-20A5 degasser and CBM-20A integrator. UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1 were used. Reverse phase chromatography analyses were carried out with a Cadenza CD-C18 column 150x4.6 mm (Imtakt) packed with 5 μ m diameter particles, volume injection was 5 μ L and the gradient elution was using a mobile phase consists of 5% CH_3CN (1% TFA) (solvent A) and 90% CH_3CN (0.07% TFA) (solvent B), flow rate 0.5 mL/min. The UV absorption spectra of the standards as well as the samples were recorded in the range of 230–400nm. Samples solutions as well as the mobile phase was degassed and filtered through 0.45 μ m membrane filter (Millipore). Chromatographic operations were carried out at 40°C. Identification of the compounds was done by comparison of their retention's time and UV absorption spectrum with those of the authentic standards.

2.7. ABTS radical cation (ABTS^{•+}) scavenging activity assay.

ABTS^{•+} radical scavenging activities of samples were determined as described by You *et al.* (2010) with slight modification. The ABTS^{•+} solution was prepared with final concentration of 7 mM ABTS^{•+} and 2.45 mM potassium persulfate. The mixture was left in the dark room temperature for 12 -16 h before use. Prior to the assay, the ABTS^{•+} solution was diluted with 0.2 M sodium phosphate buffered saline (pH 7.4) to an absorbance of 0.70±0.002 at 734 nm. Then 40 µL of the sample containing 2.0 mg/mL were added to 4 mL of diluted ABTS^{•+} solution. The mixture was shaken vigorously for 30s and left in the dark for 6 min. An equivalent volume of distilled water instead of the sample was used for the blank. The absorbance of the resultant solution was measured at 734nm. The capability to scavenge the ABTS^{•+} was calculated using the following equation: $ABTS^{•+} (\%) = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$, where A control is the absorbance of the blank without extract, and A sample is the absorbance in the presence of the extract.

2.8. Scavenging Effect on DPPH Free Radical

The scavenging effect of samples on α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) free radical was measured according to the method of Shimada, Fujikawa, Yahara and Nakamura (1992) with slight modifications. A volume of 1mL of each sample was added to 2mL of 0.1mM DPPH in 95% ethanol. The mixture was shaken and left for 30 min at room temperature, and the absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm. The antioxidant activity was calculated as $[(Ac - As) / Ac] \times 100\%$, where Ac and As are the absorbance of the control and sample, respectively.

2.9. Hydrogen peroxide scavenging activity

The hydrogen peroxide scavenging activity was determined according to the method of Muller (1985). A 100 μ L amount of 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) was mixed with sampel extracts in a 96-microwellplate. A 20 μ L amount of 10 mM hydrogen peroxide was then added to the mixture, followed by incubation at 37°C for 5 min. After the incubation, 30 μ L of 1.25 mM ABTS and 30 μ L of peroxidase (1 unit/mL) were added to the mixture, followed by incubation at 37°C for 10 min. Finally, the absorbance was recorded at 405nm by microplate reader.

2.10. Hydroxyl radical scavenging activity

The deoxyribose non site-specific hydroxyl radical scavenging activity of the various sample extracts was determined according to the method of Chung, Osawa, and Kawakishi (1997). Hydroxyl radicals were generated by a Fenton reaction in the presence of FeSO₄. A reaction mixture containing 0.1 mL of 10 mM FeSO₄, 10mM EDTA, and 10 mM 2-deoxyribose was mixed with 0.1 mL of hydrolysate, after which 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) was added to the mixture until the total volume reached 0.9 mL. Subsequently, 0.1 mL of 10 mM H₂O₂ was added and the reaction mixture was incubated at 37°C for 4 h. After incubation, 0.5 mL each of 2.8% TCA and 1.0% TBA were added to the mixture, which was then placed in a boiling water bath for 10 min. Finally, the absorbance was measured at 532nm.

2.11. Superoxide anion radical scavenging activity

For the superoxide anion scavenging activity measurement, the autoxidation of a pyrogallol method described by Tang, Wang and Yang (2009) was followed with slight modification. Briefly, 10 mL of sample was mixed with 1.8 mL of 50 mM Tris-

HCl buffer (pH 8.2). The mixture was incubated at 25°C for 10 min, and then 0.1 mL of 10 mM pyrogallol (dissolved in 10 mM HCl) was added. The absorbance of the solution at 320 nm was measured up to 4 min. The oxidation rate of pyrogallol for sample was calculated as the slope of the absorbance line (ΔA_s). The autoxidation rate pyrogallol for control was measured with 1.0 mL of double-distilled water (ΔA_0). The superoxide anion scavenging activity was calculated as $[(\Delta A_0 - \Delta A_s) / \Delta A_0] \times 100\%$.

2.12. Reducing power assay

The reducing power of sampel was determined according to the method of Ahmadi, Kadivar, & Shahedi (2007) with slight modification. The samples were dissolved in distilled water to obtain a concentration of 2.0 mg/mL. An aliquot (2.0 mL) was mixed with 2.0 mL of sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) and 2.0 mL of 1% (w/v) potassium ferricyanide. The mixture was incubated at 50°C for 20 min. Then, 2.0 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture. After centrifugation at 3000 rpm for 10 min, 2.0 mL of the supernatant was collected and mixed with 2.0 mL of distilled water and 4.0 mL of 0.1% (w/v) FeCl₃. After standing at room temperature for 10 min, the absorbance was measured at 700nm. An equivalent volume of distilled water instead of the sample was used as the blank.

2.13. Assessment of DNA damage

The protective effect of oxidative DNA damage of the sample extracts was performed according to the method of Arnao (2000) with slight modifications, as detail reported by Siswoyo, Mardiana, Lee and Hoshokawa (2013). A reaction was induced by placing the following reagents in an Eppendorf tube: 0.5 µg of pBblueScript DNA was added to the mixing solution (30 mM H₂O₂, 50 µM ascorbic

acid, and 80 μM FeCl_3) that contained 25 μg of FMF and UMF. The final volume of the mixture was brought up to 20 μL with deionized distilled water. The mixture was then incubated for 30 min at 37°C. Finally, the mixture was subjected to 1% agarose gel electrophoresis, after which the DNA bands (supercoiled and open circular) were stained with ethidium bromide.

2.14. Statistical analysis

Values were obtained as the means \pm standard deviation of 3 determinations, following ANOVA and analyzed by LSD. Differences among samples were considered significant at $p < 0.05$.

3. Result

3.1. Changes of the total phenolics during melinjo flour fermentation

Changes in total phenolics during melinjo flour fermentation are shown in **Fig. 1**. The total phenolics increased markedly from the starting amount of 10,69 mgGAE/gr sample at the end of fermentation (25h). The increased of total phenolic around 1.3 time than the unfermented treatment (8.16 mgGAE/gr). The FMF extracts had significantly higher TPC than that of unfermented samples (UMF). As reported by Lee, Yang and Mau (2008) and Xiao et al. (2014) that microbial fermentation significantly increased ($p < 0.05$) the TPC of the legume products. Chandrasekara and Shahidi (2012) also demonstrated that phenolic compounds bounded to the insoluble fiber were released during microbial fermentation. Lee, Yang and Mau (2008) demonstrated that glucosidase enzyme produced by the organism during fermentation process was responsible for polyphenol content enhancement. Svensson, Sekwati-Monang, Lutz, Schieber, & Gänzle, (2011) suggested that

fermentation by *L. fermentum* was an adequate process for improving the concentration of phenolic compounds in fermented sorghum (*Sorghum bicolor*) flour. McCue, Horii and Shetty (2003) reported that the total soluble phenolic content increased by 120–135% in the soybean seeds due to possible involvement of lignin remobilization and/or degradation activities, as well as phenolic detoxification activities, by microbial fermentation. Higher TPC in fermented melinjo flour observed in our results might be due to formation or mobilization of free phenolic molecules during *L. fermentum* fermentation. To the best of our knowledge, melinjo seeds were commonly the sources used in previous reports where stilbenoids were studied (Kato, Tokunaga, & Sakan, 2009). In the present investigation, four stilbenoids, namely, gnetifolin E, gnemonoside E, resveratrol and gnetin C were identified in the melinjo flour extracts before and after fermentation, as monitored by HPLC-DAD analysis (**Fig. 2**). As shown in **Fig. 2**, gnetin C concentration in FMF significantly increased during fermentation, gnetin C was significantly increased ($p < 0.05$), which were about 3-fold higher, compared to the UMF. **Figure 2** also indicated that phenolic contents obtained were much lower than that obtained from TPC, this was possibly due to the fact that some of the minor phenolics compounds were not identified in the HPLC analysis. Several studies have demonstrated that the content of phenolic in legume product was increased after microbial fermentation, which may be due to the changes of glucosidase activity (Svensson, Sekwati-Monang, Lutz, Schieber & Gänzle, 2010; Rekha & Vijayalakshmi, 2011). Svensson, Sekwati-Monang, Lutz, Schieber and Gänzle (2010) reported that *Lactobacillus fermentum* was able to efficiently bio-transform of phenolic or flavonoids to their bioactive compounds, thus could be used as a functional starter culture to increase the antioxidant activity of plant foods during fermentation. This could be due to the

transformation of compounds present in the unfermented flour in the processes of fermentation treatment and subsequent in vitro simulated enzymatic digestion and microbial fermentation. However, in vitro antioxidant activities demonstrated by stable compounds that were present in the extracts, in the present work further proved that transformed stilbenoids could serve as active antioxidant compounds. It has been reported that stilbenoids such as gnetin C in melinjo seed are showed DPPH radical scavenging effect, lipase and α -amylase inhibition activity, and antimicrobial activity against food microorganisms and enterobacteria (Kato, Tokunaga, & Sakan, 2009).

3.2. ABTS and DPPH Radical Scavenging Activity

DPPH and ABTS radical are widely used to test the ability of free radical scavenger, hydrogen donors or chain breaking antioxidant, in evaluating the antioxidant activity of foods, and to quantify antioxidants in complex biological systems. **Figure 3A and B** shows the radical scavenging activities of the bacterial (*Lactobacillus fermentum*) during primary fermentation. Unfermented melinjo flour showed low radical scavenging activities at 20% reduction of DPPH and 46% reduction of ABTS. The DPPH radical and ABTS radical scavenging activities of all the samples increased significantly ($p < 0.05$) from beginning and reached a plateau at 46% of melinjo flour extract for DPPH radical at the 8h, and 66% of melinjo flour extract for ABTS radical at the 12 h of fermentation. The DPPH radical scavenging activity of all the sample remained constant after 12 h of the fermentation, while their ABTS radical scavenging activity still increased until 25 h. The DPPH and ABTS radical scavenging of the melinjo flour extract with 24 h post fermentation (the final product) were determined at 51 and 77%, respectively.

Furthermore, as shown in **Fig. 4A and B**, the ABTS and DPPH radical scavenging activity of both FMF and UMF extract increased as the dosage of extract increased. It was also found that extract from FMF exhibited a significantly higher ($p < 0.05$) radical scavenging than the extract from UMF. At 10–50 μg GAE/mL, the DPPH radical scavenging activity of UMF extracts ranged from 10 to 20 %, while it ranged from 20 to 60% for FMF extracts. Whereas ABTS radical scavenging activity of UMF extract ranged from 17.0 to 51.6%, while it ranged from 33.5 to 84.6% for FMF extracts, at 0.2-1.0 μg GAE/ml. The higher ABTS⁺ and DPPH radical scavenging ability of FMF might be attributed to the presence of higher phenolic contents. Xiao *et al.* (2015) demonstrated that higher ABTS and DPPH radical scavenging activity were obtained from *Lactobacillus plantarum* B1-6 fermented soy whey extracts than the unfermented samples, which was explained by the higher content of total phenolics and flavonoids of fermented black soybean. It was reported by Singh, Singh, Singh and Nautiyal (2010) that phenolic and flavonoid compounds have been shown involved in termination of free radical reactions, and then exhibit a scavenging effect for free radicals. FMF and UMF are free radical inhibitors or scavengers, acting possibly as primary antioxidants. Antioxidant activity of natural antioxidants has been shown to be involved in the termination of free radical reactions (Lee, Yang & Mau, 2008). The observation demonstrated improving of the free radical scavenging ability to be mainly attributed to the fermentation process. This indicates that bacterial (*Lactobacillus fermentum*) primary fermentation endowed the melinjo flour with high antioxidant activity against the ABTS⁺ and DPPH radicals.

3.3. Hydrogen Peroxyl and Hydroxyl Radical Scavenging Activity

The measurement of hydrogen peroxide scavenging activity is known to be one of the most useful methods for determining the ability of an antioxidant to decrease levels of pro-oxidants such as hydrogen peroxide (Czochra & Widensk, 2002). The scavenging of hydrogen peroxide by antioxidants can be attributed to their electron donating ability. The hydrogen peroxide scavenging activity of the sample extracts is shown in **Fig. 5A**. As shown in **Fig. 5A**, the sample extracts showed good hydrogen peroxide scavenging activity in the concentration range of 0.5-2 μg GAE/ml. The both samples showed the high hydrogen peroxide scavenging activity were 89.6% for FMF and 89.2% for UMF. The activity was presented in a dose-dependent manner. Hydrogen peroxide is a weak oxidizing agent that inactivates some enzymes directly, usually by the oxidation of essential thiol groups (Hazra, Biswas & Mandal, 2008). Hydrogen peroxide, which is a reactive non radical, is very important because it can penetrate biological membranes. Although hydrogen peroxide itself is not very reactive, it is easily converted into more reactive species such as singlet oxygen and hydroxyl radicals, which can then initiate lipid peroxidation or induce toxic effects in cells. In this study, we clearly demonstrated that fermented melinjo flour can significantly quench hydrogen peroxide with high potency

Among the reactive oxygen species (ROS), hydroxyl radical is a major active oxygen species having the strongest chemical reactivity. It reacts most easily with amino acids, DNA, and membrane components, thereby causing enormous biological damage. Therefore, the removal of hydroxyl radicals is one of the most effective defense mechanisms of a living body against various diseases. The

hydroxyl radical scavenging activities of the FMF and UMF samples are illustrated in **Fig. 5B**. It is shown that the FMF extract has a significantly higher ($p < 0.05$) hydroxyl radical scavenging activity at concentrations of 10-50 μg GAE/ml. For UMF and FMF, at 10 μg GAE/ml, scavenging hydroxyl radical were 13.15 and 24.5%, respectively. Higher hydroxyl radical scavenging effect of FMF extracts might be due to their higher contents of phenolics. Many studies have reported that phenolics exhibit hydroxyl radical scavenging activity. It seems that the amount of the phenolic and the kinds of stilbenoids (gnetin C) played an important role in their scavenging activity. (Chandrasekara & Shahidi, 2012; Singh, Singh, Singh & Nautiyal, 2010). Chandrasekara and Shahidi (2012) reported that phenolic compounds present in sample extracts were effective ferrous ion chelating agents; hydroxyl radical scavenging activity observed could be due to the direct scavenging of hydroxyl radicals and/or chelating of ferrous ions which are needed to generate hydroxyl radicals in the assay system. Both FMF and UMF extracts contained high amounts of phenolics (**Table 1**), which were responsible for the strong scavenging ability for hydroxyl radicals. In addition, soybean broth fermented with *Acetobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Saccharomyces* sp. and *Streptomyces* sp. showed better scavenging abilities for hydroxyl radicals than unfermented soybean broth (Yang *et al.*, 2000). It seems that *L. fermentum* might possess more hydroxyl radical scavenging components which are formed during fermentation.

3.4. Inhibition of Oxidative DNA Damage

In this work, we also evaluated the oxidative DNA damage protective activity of the FMF and UMF against hydroxyl radical induced DNA damage on pBluescript plasmid DNA, by an in vitro method. In the case of plasmids, a single-strand break in

supercoiled (SC) plasmid DNA, exposed to hydroxyl radical derived from the Fenton reaction, leads to the formation of open circular (OC) DNA and linear (Ln) DNA. As shown in **Fig. 6**, the incubation of pBluescript plasmid DNA with Fenton's reagent for 25 min gave rise to cleavage of SC and OC to make the Ln form in lane 5, indicating that the hydroxyl radical generated by the Fenton reaction produced single-strand DNA breaks. However, the addition of the sample extracts (FMF and UMF) at 40 μg GAE to the DNA and Fenton's reagent mixture significantly decreased the conversion of SC and OC DNA to Ln DNA. It was reported by Singh, Singh, Singh and Nautiyal (2010) that fermented legume extracts showed higher DNA damage protection than unfermented legume extracts due to higher phenolic and flavonoid contents in the fermented samples. Sevgi, Tepe, and Sarikurkcu (2015) reported that the oxidation of DNA was inhibited mainly due to a higher concentration of free phenolic groups in their structure capable of scavenging hydroxyl radicals generated by Fenton's reaction. Chandrasekara and Shahidi (2011) have determined the abilities of phenolic extracts of millet grains to inhibit the plasmid DNA oxidation. Moktan, Saha, and Sarkar (2008) reported that redox-active metals in solution might bind to phenolic compounds produced during fermentation of legume products and complexes were formed, thus consequently preventing the reduction of redox-active metal ions with H_2O_2 . Therefore, the mechanism of FMF extract capable of protecting DNA from hydroxyl radical induced strand breaks might be due to prevention of the reaction of Fe^{3+} ions with H_2O_2 and diminishing of the reduction potential of Fe ions, which have led to the inhibition of Fenton-like reaction.

Acknowledgements

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

References

- Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of *Kellussia odoratissima* Moza in model and food system. *Food Chemistry*, 105, 57-64.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 419-421.
- Baur, J. A., Pearson, K. J., & Price, N. L. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 7117, 337-342.
- Baur, J.A., & Sinclair, D.A., (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 493-506.
- Brasnyó, P., Molnár, G. A., & Mohás, M. (2011). Resveratrol improves insulin sensitivity, reduces oxidative stress and activates the Akt pathway in type 2 diabetic patients. *British Journal of Nutrition*, 106, 383-389.
- Chung, S. K., Osawa, T., & Kawakishi, S. (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 118-123.
- Czochra, M.P., & Widensk, A. (2002). Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *J. Anl. chemic. ACTA*, 452,177- 184

- Dastmalchi, K., Damien, D.H.J., Kosar, M., & Hiltunen R. (2007). Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 40, 239–248
- Hazra, Biswas, & Mandal (2008) Antioxidant and free radical activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med*. 8, 63-73.
- Heiniö, R.L., Katina, K., Wilhelmson, A., Myllymäki, O., Rajamäki, T., & Latva-Kala, K., (2003). Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough fermented and native rye following the extrusion process. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36,533–545.
- Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K.H., Kariluoto, S., & Piironen, V., (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology*, 24, 175–186.
- Kato, E., Tokunaga, Y., & Sakan, F. (2009) Stilbenoids isolated from the seeds of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and their biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 2544-2549.
- Kato, H., Samizo, M., Kawabata, R., Takano, F. & Ohta, T. (2011) Stilbenoids from the melinjo (*Gnetum gnemon* L) fruit modulate cytokine production in murine peyer's patch cells ex vivo. *Planta Medica*. 77, 1027-1034.
- Kunimasa, K., Ohta, T. & Tani, H. (2011) Resveratrol derivative rich melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract suppresses multiple angiogenesis-related endothelial

- cell functions and tumor angiogenesis. *Molecular Nutrition and Food Research*. 55, 1730–1734.
- Lee, Y.L., Yang, J.H., & Mau, J.L. (2008). Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. *Food Chemistry*, 106, 1128–1137.
- Muller, H. E. (1985). Detection of hydrogen peroxide produced by microorganism on ABTS-peroxidase medium. *Zentralbl Bacteriology Microbiology Hygiene*, 259, 151-158.
- Rekha, C.R., & Vijayalakshmi G. (2011). Isoflavone phytoestrogens in soymilk fermented with β -glucosidase producing probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Sci Nutr*. 62, 111-120
- Sevgi, K., Tepe, B., & Sarikurkcu, C. (2015) Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 12–21
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40, 945–948.
- Singh, H. B., Singh, B. N., Singh, S. P., & Nautiyal, C. S. (2010). Solid-state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. *Bioresource Technology*, 10, 6444–6453.
- Siswoyo, T.A., Mardiana, E, Lee, K. O & Hoshokawa, K. (2011). Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 5648-5656.

- Svensson, L., Sekwati-Monang, B., Lutz, D.L., Schieber, A., & Gänzle, M.G. (2010). Phenolic acids and flavonoids in nonfermented and fermented red sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9214-9220.
- Taga, M.S., Miller, E.E., Pratt, D.E. (1984). Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 928-931.
- Tepe, B., Sokmen, M., Askin A. H., & Sokmen, A. (2004). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, 15, 685–689
- Tepe, B, & Sokmen, A. (2007). Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkey flora. *Bioresource Technol.*, 98, 3076–3079
- Tang, C.H., Wang, W.S & Yang, X.Q (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysate. *Food Chemistry*, 111,370-376.
- Wong, R.H.X., Howe, P.R.C., Buckley, J.D., Coates, A.M., Kunz, I., & Berry, N.M. (2011). Acute resveratrol supplementation improves flow-mediated dilatation in overweight/obese individuals with mildly elevated blood pressure. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21, 851–856
- Xiao, Y., Wang, L., Rui, X., Li, W., Chen X., Jiang, M, & Dong, M. (2015). Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1–6. *Journal of Functional Foods*, 12, 33–44.

Yang, J.-H., Mau, J.-L., Ko, P.-T., & Huang, L.C. (2000). Antioxidant properties of fermented soybean broth. *Food Chemistry*, 71, 249–254.

You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Change in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120, 810–816.

Legend of Figures

- Figure 1.** Change in the total phenolic of melinjo flour during fermentation process.
- Figure 2.** Characteristic HPLC chromatograms showing the biotransformation of compound in melinjo flour fermented with *Lactobacillus fermentum*. A. Unfermented mlinjo flour, B. Fermented mlinjo flour. Detection :254 nm. Peak denotation: 1.Gnetifolin E, 2. Gnemonoside E, 3. Resveratrol, 4.Gnetin C.
- Figure 3.** Change in the DPPH (A) and ABTS (B) radical scavenging activity of melinjo flour during fermentation process.
- Figure 4.** Antioxidant activities of 50% methanolic extracts from fermented and unfermented melinjo flour. (A) ABTS radical cation scavenging activity, (B) DPPH radical scavenging activity, Each value was expressed as mean \pm SD (n = 3).
- Figure 5.** Antioxidant activities of 50% methanolic extracts from fermented and unfermented melinjo flour. (A) hydrogen peroxide scavenging activity, (B) hydroxyl radical scavenging activity. Each value was expressed as mean \pm SD (n = 3).
- Figure 6.** Inhibitory effect of sampels (UMF and FMF) on DNA nicking induced by hydroxyl radicals. Each reaction solution (20 μ L) contained 30 mM H₂O₂, 50 μ M ascorbic acid, and 80 μ M FeCl₃. The DNA nicking was initiated by mixing 0.5 μ g of pBluescript plasmid DNA with the reaction solution for 0, 5, 10, 20 and 25 min (lanes 1, 2, 3, 4 and 5, respectively) and UMF and FMF (lanes 6, and 7) (B) at 37°C. The reaction was stopped by adding 4 μ L of the loading buffer. SC, supercoiled; OC, open circular.

Lampiran 3. Draf Patent

Deskripsi

PROSES PRODUKSI DAUN MELINJO (*Gnetum gnemon*) SEBAGAI MELINJO GREEN LEAF LIKE TEA

Bidang Teknik Invensi

Invensi ini berhubungan dengan suatu proses produksi protein antioksidan, lebih khusus lagi senyawa aktif antioksidan dari daun melinjo (*Gnetum gnemon*) sebagai bahan *Melinjo Green Leaf Like Tea*.

Latar Belakang Invensi

Dalam kehidupan dunia modern saat ini, tubuh kita mendapatkan serangan-serangan yang sering tidak kita sadari dapat membahayakan kesehatan tubuh. Polusi, limbah, pestisida dan pemanasan global yang sedang terjadi, menyebabkan bertumbuhnya mikroba-mikroba, baik dari segi jumlah maupun jenisnya. Penipisan ozon juga menyebabkan adanya radiasi sinar ultraviolet ke permukaan bumi. Untuk melindungi diri dari serangan yang berasal dari berbagai macam aspek tersebut, kita membutuhkan sistem pertahanan tubuh yang baik. Kita membutuhkan suatu nutrisi yang secara alami dapat meningkatkan kekebalan tubuh kita tanpa menimbulkan efek samping. Sumber alami dapat diperoleh dari hewan atau tumbuhan. Indonesia kaya

akan biodiversitas tumbuhan lokal yang berpotensi sebagai sumber pangan fungsional.

Antioksidan merupakan zat yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi. Zat ini secara nyata mampu memperlambat atau menghambat oksidasi zat yang mudah teroksidasi meskipun dalam konsentrasi rendah. Radikal bebas adalah spesies yang tidak stabil karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dan mencari pasangan elektron dalam makromolekul biologi. Kondisi oksidasi dapat menyebabkan kerusakan protein dan DNA. Komponen kimia yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa golongan fenolik dan polifenolik. Senyawa-senyawa golongan tersebut banyak terdapat di alam, terutama pada tumbuh-tumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas. Antioksidan yang banyak ditemukan pada bahan pangan, antara lain vitamin E, vitamin C dan karotenoid (Anonim, 2012a).

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon*) merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara lainnya sebagai bahan dasar tepung dari biji melinjo. Komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein dan 1% phenolik (Siswoyo dan Aldino, 2007). Kandungan protein pada biji melinjo yang relatif sangat sangat besar merupakan suatu potensi sebagai sumber protein fungsional alami. Bagian tanaman melinjo seperti daun, akar, kulit batang dan biji melinjo mempunyai potensi aktif sebagai sumber antioksidan (Siswoyo et. al., 2007; Siswoyo et. al., 2011).

Siswoyo *et. al.*, (2011), menilai bahwa aktivitas antioksidan biji melinjo setara dengan vitamin C. Aktivitas antioksidan ini diperoleh dari konsentrasi protein tinggi, 9-10 persen dalam tiap biji melinjo. Protein utamanya sangat efektif untuk menangkal radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit, seperti hipertensi, kolesterol tinggi, penyempitan pembuluh darah dan penuaan dini.

Invensi ini akan menyediakan suatu proses produksi protein antioksidan dari daun melinjo sebagai *Melinjo Green Leaf Like Tea*. Dari hal tersebut diperlukan suatu proses yang dapat memperbaiki kandungan protein antioksidan pada daun melinjo.

Uraian Singkat Invensi

Obyek yang dihasilkan invensi ini menyediakan teknik produksi untuk menghasilkan ekstrak daun melinjo yang mempunyai tingkat kandungan protein antioksidan tinggi.

Teknik produksi ekstrak daun melinjo meliputi langkah-langkah berikut:

- a) Memetik daun melinjo pada helaian daun pertama hingga helaian daun ketiga
- b) Daun melinjo dikeringkan pada suhu 40-50⁰C selama 24-48 jam.
- c) Daun melinjo dihancurkan menjadi serbuk
- d) Disaring pada ukuran 100 mesh
- e) Ekstrak daun dilarutkan dengan aquadest pada suhu 80-100⁰C.

Uraian Lengkap Invensi

Bahan baku yang digunakan adalah daun melinjo helai pertama hingga ke tiga yang diperoleh dari pohon tanaman melinjo daerah jember. Daun yang telah dipetik kemudian dikeringkan pada oven dengan suhu berkisar antara 40-50⁰C. Daun dikeringkan selama 24-48 jam, kemudian daun kering dihancurkan menjadi serbuk dan disaring dengan menggunakan penyaring berukuran 100 mesh. Dari 51,39 gram berat kering daun melinjo, didapatkan 35,57 gram serbuk daun melinjo (fine) dan 14,69 gram serat daun melinjo (coarse). Masukkan 1 mL Aquadest kedalam ependorf kemudian dipanaskan pada suhu berkisar 80-100⁰C. Ekstrak daun melinjo ditimbang sebanyak 1 mg, kemudian dimasukkan secepat mungkin ke dalam ependorf yang telah dipanaskan. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Tahap terakhir diperoleh aktivitas antioksidant sebesar 1,129 U/mg.

Klaim

Proses produksi *Melinjo Leaf Like Tea* dari daun melinjo meliputi langkah-langkah berikut :

- a) Pengeringan daun melinjo dilakukan pada suhu 40-50⁰C selama 24-48 jam.
- b) Ekstrak daun melinjo dilarutkan kedalam aquadest bersuhu berkisar 80-100⁰C.

