



UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*) TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA NEUTROFIL IN VITRO

SKRIPSI

Oleh
A.A. Istri Puspita Sari Dewi
NIM 121610101087

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*) TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA NEUTROFIL IN VITRO

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh
A.A. Istri Puspita Sari Dewi
NIM 121610101087

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Tuhan Yang Maha Esa atas ijin dan kehendak-Nya saya dapat menyelesaikan tugas akhir ini dengan lancar. Terima kasih atas segala nikmat, karunia, dan anugrah-Mu, Tuhan;
2. Orang tuaku tercinta, A.A. Istri Gunawati dan Ayahanda A.A. Ngurah Suryadharma yang senantiasa telah membesarkan, mendidik, mendukung, memberikan kasih sayang, pengorbanan, dan doa sehingga membantuku menjadi manusia yang lebih baik dan kuat menghadapi segala sesuatu. Senyum dan kebahagiaan mereka adalah harapan terbesarku;
3. Sahabat – sahabat saya yang selalu menemani dalam penyelesaian tugas akhir ini;
4. Dosen – dosen pembimbingku, Dr. Drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes., dan Bapak Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M. Agr., Ph.D yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dukungan, dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
5. Guru – guru dan dosen terhormat, yang telah mengajari dan membimbing saya dalam berbagai hal;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Jadilah kamu manusia yang pada kehadiranmu semua orang tertawa bahagia, tetapi hanya kamu sendiri yang menangis; dan pada kematianmu semua orang menangis sedih, tetapi hanya kamu sendiri yang tersenyum”. *)

“Rahmat sering datang kepada kita dalam bentuk kesakitan, kehilangan, dan kekecewaan; tetapi kalau kita sabar, kita segera akan melihat bentuk aslinya”.**)

*) Mahatma Gandhi

***) Joseph Addison

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : A.A. Istri Puspita Sari Dewi

NIM : 121610101087

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Neutrofil in Vitro” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan 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 sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 April 2016

Yang menyatakan,

A.A. Istri Puspita Sari Dewi

NIM 121610101087

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*) TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA NEUTROFIL IN VITRO

Oleh:

A.A. Istri Puspita Sari Dewi
NIM 121610101087

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes
Dosen Pembimbing Pendamping : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Neutrofil in Vitro” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Rabu, 13 April 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Pendamping

drg. Izzata Barid, M. Kes
NIP. 196805171997022001

drg. Zahara Meilawaty, M. Kes
NIP. 198005272008122002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. drg. IDA Susilawati, M. Kes
NIP. 196109031986022001

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

Dekan,

drg. R Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros.

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Neutrofil *in Vitro*; A.A. Istri Puspita Sari Dewi, 121610101087; 2016; 120 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Radikal superoksida (O_2^-) merupakan salah satu jenis *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berperan pada patogenesis berbagai penyakit. Jenis sel utama penghasil ROS dalam tubuh manusia adalah neutrofil. Neutrofil memproduksi ROS secara normal untuk menjalankan fungsi *signaling* dan fagositosis bakteri, namun saat inflamasi neutrofil memproduksi ROS melebihi kemampuan antioksidan seluler yang menyebabkan stres oksidatif sehingga perlu diredam menggunakan antioksidan. Salah satu sumber antioksidan alami yang sudah diteliti adalah biji melinjo. Penelitian sebelumnya menyatakan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) memiliki potensi aktif sebagai antioksidan. Namun, belum ada penelitian yang menguji aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap sel-sel manusia. Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida sel inflamatori neutrofil dan mengkaji perbedaan aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil pada inkubasi selama 1 jam dan 18 jam.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan *postest only control group design*. Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama untuk mendapatkan Gg-PH yang telah diuji aktivitas antioksidannya terhadap radikal ABTS dan pirogallol. Tahap kedua untuk menguji aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil. Objek penelitian adalah isolat neutrofil yang dibagi menjadi 3 kelompok yaitu: (1) neutrofil yang dipapar protein Gg-PH (kelompok Gg-PH), (2) neutrofil yang dipapar protein antioksidan GSH sebagai kontrol positif (kelompok GSH), dan (3) neutrofil yang dipapar antigen fMLP sebagai kontrol

negatif (kelompok FMLP). Penelitian pendahuluan menunjukkan produksi radikal superoksida neutrofil setelah dipapar *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine* (FMLP) pada inkubasi selama 1,2, dan 3 jam belum terlihat secara visual di *well plate* sehingga tiap kelompok dibagi menjadi dua sub kelompok yaitu inkubasi 1 dan 18 jam. Aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh berkurangnya produksi radikal superoksida yang dianalisis dengan metode *Nitroblue Tetrazolium* (NBT). Produksi radikal superoksida intra seluler diamati secara mikroskopis dan ekstra seluler dengan spektrofotometri.

Hasil penelitian mendapatkan Gg-PH konsentrasi 3,187 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dengan derajat hidrolisis 38%. Aktivitas antioksidan Gg-PH (6 μg) pada uji ABTS adalah 80%, sedangkan pada uji superoksida pirogalol (30 μg) 30,38%. Protein Gg-PH 30 μg ini kemudian dipaparkan pada neutrofil. Uji neutrofil menunjukkan Gg-PH menghasilkan produksi radikal superoksida intra seluler lebih kecil secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan GSH dan FMLP baik pada inkubasi 1 maupun 18 jam. Kelompok inkubasi 18 jam menghasilkan produksi radikal superoksida intra seluler lebih besar secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok inkubasi 1 jam. Produksi radikal superoksida ekstra seluler pada ketiga kelompok penelitian baik inkubasi 1 maupun 18 jam tidak memiliki perbedaan bermakna ($p > 0,05$).

Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) mampu meredam produksi radikal superoksida neutrofil. Terdapat perbedaan yang bermakna antara aktivitas antioksidan Gg-PH yang diinkubasi 1 jam dan 18 jam. Gg-PH mampu meredam produksi radikal superoksida neutrofil pada inkubasi selama 1 jam, sedangkan pada inkubasi 18 jam terjadi stres oksidatif sel karena konsentrasi Gg-PH yang digunakan tidak dapat meredam radikal superoksida yang terus diproduksi selama 18 jam. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang konsentrasi, durasi, jenis Gg-PH yang efektif meredam produksi radikal superoksida neutrofil. Uji *in vivo* juga diperlukan untuk meningkatkan kegunaan protein biji melinjo sebagai antioksidan alami dalam bidang kedokteran dan *neutraceutical*.

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan YME atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Neutrofil in Vitro.” Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karenanya penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M. Kes., Sp. Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
3. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M. Agr., Ph. D., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah bimbingan, saran, dan motivasi *dengan* penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Izzata Barid, M. Kes., selaku Dosen Penguji Ketua yang telah memberikan saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
5. drg. Zahara Meilawaty, M. Kes., selaku Dosen Penguji Pendamping yang telah memberikan saran dan motivasi sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. drg. Yani Corvianindya Rahayu, M. KG., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan saran dan motivasi selama saya berada di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;

7. Ayah tercinta A.A. Ngurah Suryadharma, ibu tercinta A.A. Istri Gunawati, kakakku A.A. Ngurah Narakusuma, adik – adikku A.A. Istri Berliana Permatasari dan A.A. Ngurah Abimanyu, bibiku A.A. Istri Ratnadewi, nenek, dan seluruh keluarga besarku yang selama ini telah memberi semangat dan dukungan;
8. Program BOPTN Kementerian Ristek dan Dikti yang telah mendanai sebagian dari penelitian ini;
9. Teknisi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember dan teknisi Laboratorium *Biosciences* RSGM Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember terimakasih atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian;
10. Rekan skripsi: Izza Khalida, Trianike Nor Aini, Rina Wahyu Hardiana, Vinanti Chumairhoh, dan Amalia Indrati, dan rekan kerja CDAST Zahrina Amalia, Ivan Kristantya, Nandin, dan Lilik, terimakasih atas segala dukungan, bimbingan, pendapat, dan waktunya dalam membantu skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan baik;
11. Teman-teman FKG angkatan 2012 yang telah memberikan pengalaman dan kenangan indah yang tidak bisa saya ucapkan satu persatu;
12. Semua pihak yang turut terlibat secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan tugas akhir ini. Semoga tugas akhir ini memberikan banyak manfaat.

Jember, 13 April 2016

Penulis

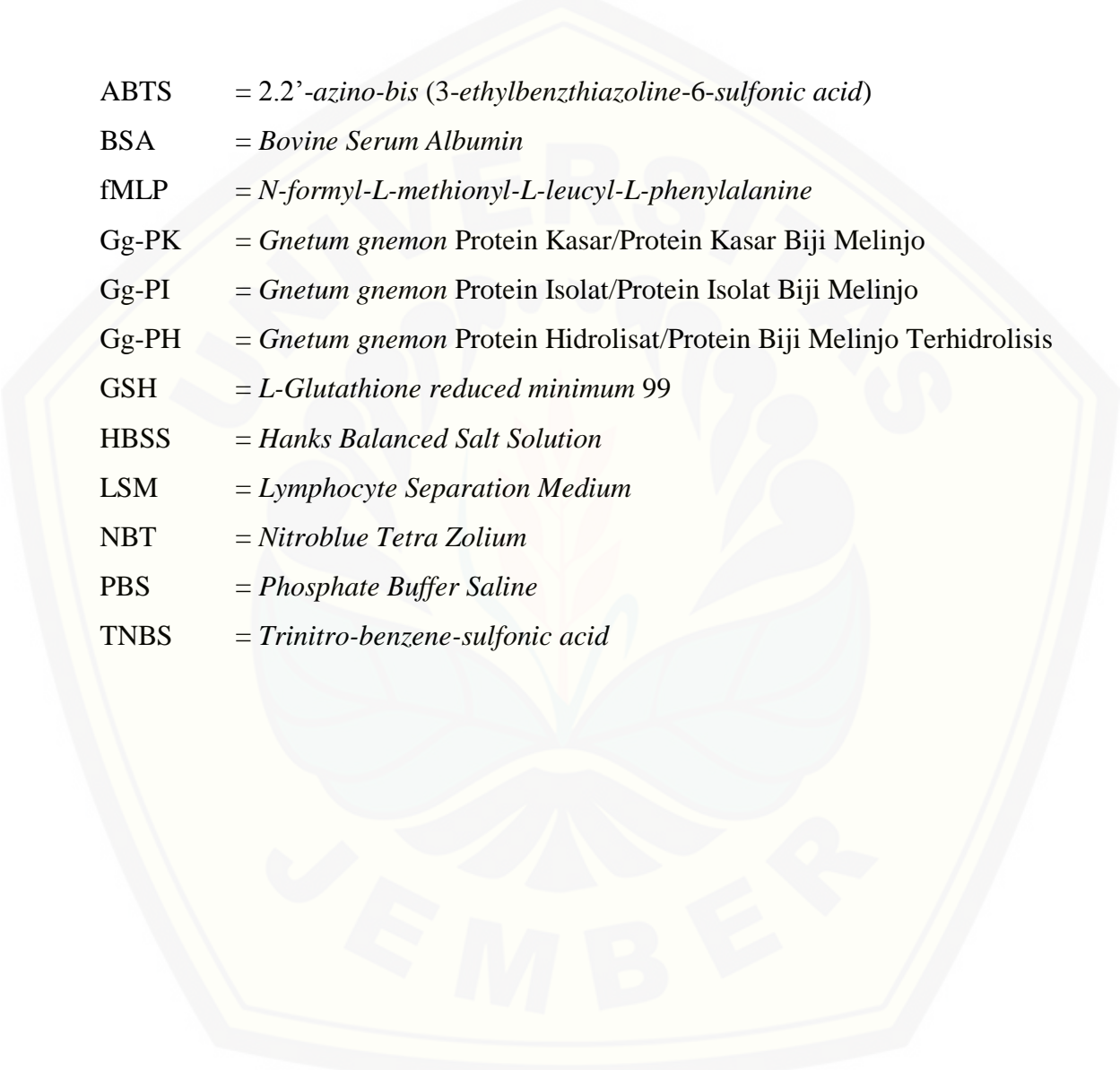
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Radikal Bebas Superoksida	5
2.1.1 <i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS).....	7
2.1.2 Radikal Superoksida	8

2.2 Neutrofil	10
2.2.1 Fungsi Neutrofil.....	12
2.2.2 <i>Respiratory Burst Neutrofil</i>	13
2.3 Antioksidan	15
2.4 Melinjo (<i>Gnetum gnemon L.</i>)	17
2.4.1 Klasifikasi Tumbuhan Melinjo	18
2.4.2 Morfologi Tumbuhan Melinjo	18
2.4.3 Habitat Tumbuhan Melinjo.....	19
2.4.4 Manfaat Tumbuhan Melinjo	19
2.4.5 Kandungan Kimia Melinjo	20
2.5 Kerangka Konsep	22
2.6 Hipotesis Penelitian	23
BAB 3. METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.3 Rancangan Penelitian	24
3.4 Identifikasi Variabel Penelitian	25
3.4.1 Variabel Bebas.....	25
3.4.2 Variabel Terikat	25
3.4.3 Perubahan Terkendali	25
3.5 Definisi Operasional	25
3.6 Objek Penelitian	26
3.6.1 Kelompok Penelitian.....	26
3.7 Alat dan Bahan Penelitian	27
3.7.1 Alat Penelitian.....	27
3.7.2 Bahan Penelitian	28
3.8 Prosedur Penelitian	28
3.8.1 Hidrolisis, Uji ABTS, dan Pirogalol Protein Biji Terhidrolisis	29

3.8.2 Uji Aktivitas Antioksidan Gg-PH terhadap Radikal Superoksida (O_2^-) Neutrofil	33
3.9 Bagan Alur Penelitian.....	38
3.10 Analisis Data.....	39
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	40
4.1 Hasil.....	40
4.1.1 Hasil Hidrolisis, Uji ABTS, dan Pirogalol Protein Biji Melinjo Terhidrolisis.....	40
4.1.2 Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo Terhidrolisis (Gg-PH) terhadap Radikal Superoksida Neutrofil.....	43
4.1.3 Analisis Data.....	46
4.2 Pembahasan	47
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	62

DAFTAR SINGKATAN



ABTS	= 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
BSA	= <i>Bovine Serum Albumin</i>
fMLP	= <i>N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine</i>
Gg-PK	= <i>Gnetum gnemon</i> Protein Kasar/Protein Kasar Biji Melinjo
Gg-PI	= <i>Gnetum gnemon</i> Protein Isolat/Protein Isolat Biji Melinjo
Gg-PH	= <i>Gnetum gnemon</i> Protein Hidrolisat/Protein Biji Melinjo Terhidrolisis
GSH	= <i>L-Glutathione reduced minimum 99</i>
HBSS	= <i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
LSM	= <i>Lymphocyte Separation Medium</i>
NBT	= <i>Nitroblue Tetra Zolium</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffer Saline</i>
TNBS	= <i>Trinitro-benzene-sulfonic acid</i>

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Tipe radikal bebas	6
2.2 Kandungan gizi biji melinjo (100 gr)	21
3.1 Kelompok penelitian aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil (uji NBT)	27

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Proses reduksi satu elektron pada oksigen yang menghasilkan radikal superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil.....	10
2.2 Sel neutrofil yang dikelilingi eritrosit, pembesaran 1000x.....	11
2.3 Pembentukan ROS selama <i>respiratory burst</i> oleh neutrofil.....	14
2.4 Buah melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	18
2.5 Kerangka konsep penelitian	22
3.1 Bagan alur penelitian	38
4.1 Persen inhibisi protein biji melinjo dibandingkan Glutathion (GSH) terhadap radikal bebas secara umum ABTS.....	41
4.2 Persen inhibisi protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) dalam berbagai konsentrasi terhadap radikal superoksida pirogalol	42
4.3 Produksi radikal superoksida intra seluler neutrofil inkubasi 1 & 18 jam (uji NBT) pembesaran 1000x.....	44
4.4 Rerata jumlah neutrofil yang memproduksi radikal superoksida intra seluler dalam persen (per 100 sel) (uji NBT)	45
4.5 Produksi radikal superoksida ekstra seluler (uji NBT).....	46
4.6 Pembentukan ikatan disulfida.....	50
4.7 Pembentukan NADPH oksidase dan aktivitasnya di neutrofil	52

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penghitungan Jumlah Sampel	62
B. <i>Ethical Approva</i>	63
C. Surat Ijin Penelitian	64
D. Surat Persetujuan Subjek Penelitian	66
E. Penghitungan Total Protein Terlarut Biji Melinjo (Uji Bradford)	68
F. Penghitungan Derajat Hidrolisis (DH)	69
G. Uji Radikal ABTS dan Superoksida Pirogalol	70
H. Isolasi Neutrofil	71
I. Uji Superoksida Neutrofil Intra Seluler	72
J. Uji Superoksida Neutrofil Ekstra Seluler	100
K. Analisis Data	101
L. Alat dan Bahan Penelitian	108
M. Foto Penelitian	115
N. Foto Penelitian Pendahuluan Produksi Radikal Superoksida Neutrofil	119

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan terluarnya (Clarkson, 2000). Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah *reactive oxygen species* (ROS), yang merupakan senyawa pengoksidasi turunan oksigen dan bersifat sangat reaktif (Halliwell & Whiteman, 2004). Salah satu jenis ROS adalah radikal superoksida (O_2^-) (Forman, 2002). Radikal superoksida memiliki reaktivitas tinggi karena kecenderungannya menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal (Suryohudoyo, 2010). Radikal superoksida ini dapat merusak makromolekul seperti membran lipid sel, DNA, dan protein (Marks, 2000; Valko, 2006).

Jenis sel utama penghasil radikal superoksida (O_2^-) dalam tubuh manusia adalah neutrofil. Neutrofil atau leukosit granular polimorfonuklear merupakan fagosit pertama yang berperan pada reaksi inflamasi akut (Baratawidjaja, 2004). Neutrofil menjalankan fungsi fagositosis dan penghancuran benda asing atau mikrobia melalui mekanisme oksidatif dan non oksidatif (Kirkwood, 2006). Mekanisme oksidatif merupakan mekanisme mikrobisidal utama pada neutrofil yang diperankan oleh ROS/radikal superoksida (O_2^-) (Susilawati, 2008). Pada mekanisme ini, neutrofil mengalami peningkatan penggunaan oksigen (*respiratory burst*) saat memfagosit bakteri disertai produksi sejumlah besar radikal superoksida (O_2^-) melalui reduksi O_2 oleh enzim *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) *oxidase* (Barry, 2001).

Radikal bebas penting dalam fungsi tubuh normal untuk *signaling* dan membunuh bakteri (Droge, 2002), namun jika dihasilkan melebihi kemampuan antioksidan seluler (superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathione

peroksidase (GSH-Px)) maka akan merusak sel itu sendiri (Sanmugapriya, 2006). Reaktivitas radikal bebas yang tinggi dan kecenderungannya untuk membentuk radikal baru lagi jika bertemu dengan molekul lain menyebabkan terbentuknya rantai reaksi (*chain reaction*) (Suryohudoyo, 2010). Kerusakan sel dan *chain reaction* tersebut berbahaya karena dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti diabetes, aterosklerosis, kanker, penuaan dini, neurodegeneratif, periodontitis dan berbagai penyakit lainnya (Dalle-Donne, 2006; Chapple, 2007).

Reaksi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas dapat dihentikan apabila radikal tersebut diredam (*quenched*), yakni menggunakan antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dalam konsentrasi rendah dapat menstabilkan radikal bebas dengan mendonorkan elektronnya. Antioksidan juga mampu menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas baru tanpa merubah fungsinya (Simanjuntak, 2007).

Beberapa tumbuhan mengandung senyawa antioksidan, contohnya tumbuhan melinjo (*Gnetum gnemon Linn*) yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Melinjo merupakan tumbuhan asli Indo-Malaya yang termasuk keluarga *Gnetaceae*. Tumbuhan ini mengandung senyawa antioksidan yang cukup tinggi. Biji melinjo mengandung senyawa polifenol dan gnemonoside yang memiliki aktivitas antioksidan (Hisada *et al*, 2005; Mori, 2008; Santoso, 2010). Kandungan protein tinggi dalam biji melinjo, yaitu 9-11% dalam tiap bijinya, juga memiliki potensi aktif sebagai antioksidan dengan aktivitas setara dengan vitamin C (Siswoyo *et al*, 2011).

Siswoyo *et al*. (2012), telah meneliti kemampuan antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH), yakni suatu protein biji melinjo yang sudah melewati proses modifikasi dengan menambahkan enzim alkalase. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa dua fraksi protein hasil isolasi menunjukkan kemampuan antioksidan, yaitu protein dengan berat molekul sekitar 30 kD memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan yang memiliki berat molekul 12 kD (Siswoyo *et al*, 2007). Namun demikian, sejauh ini belum diketahui bagaimana

aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) terhadap radikal bebas yang dihasilkan oleh sel-sel manusia, juga belum pernah diteliti bagaimana efeknya terhadap radikal superoksida yang dihasilkan sel inflamatori neutrofil. Penelitian pendahuluan menunjukkan produksi radikal superoksida neutrofil yang dipapar antigen *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine* (FMLP) pada inkubasi selama 1,2, dan 3 jam belum terlihat secara visual di *well plate*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka permasalahan yang dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimanakah aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) terhadap radikal superoksida neutrofil?
2. Apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) terhadap radikal superoksida neutrofil yang diinkubasi selama 1 jam dan 18 jam?

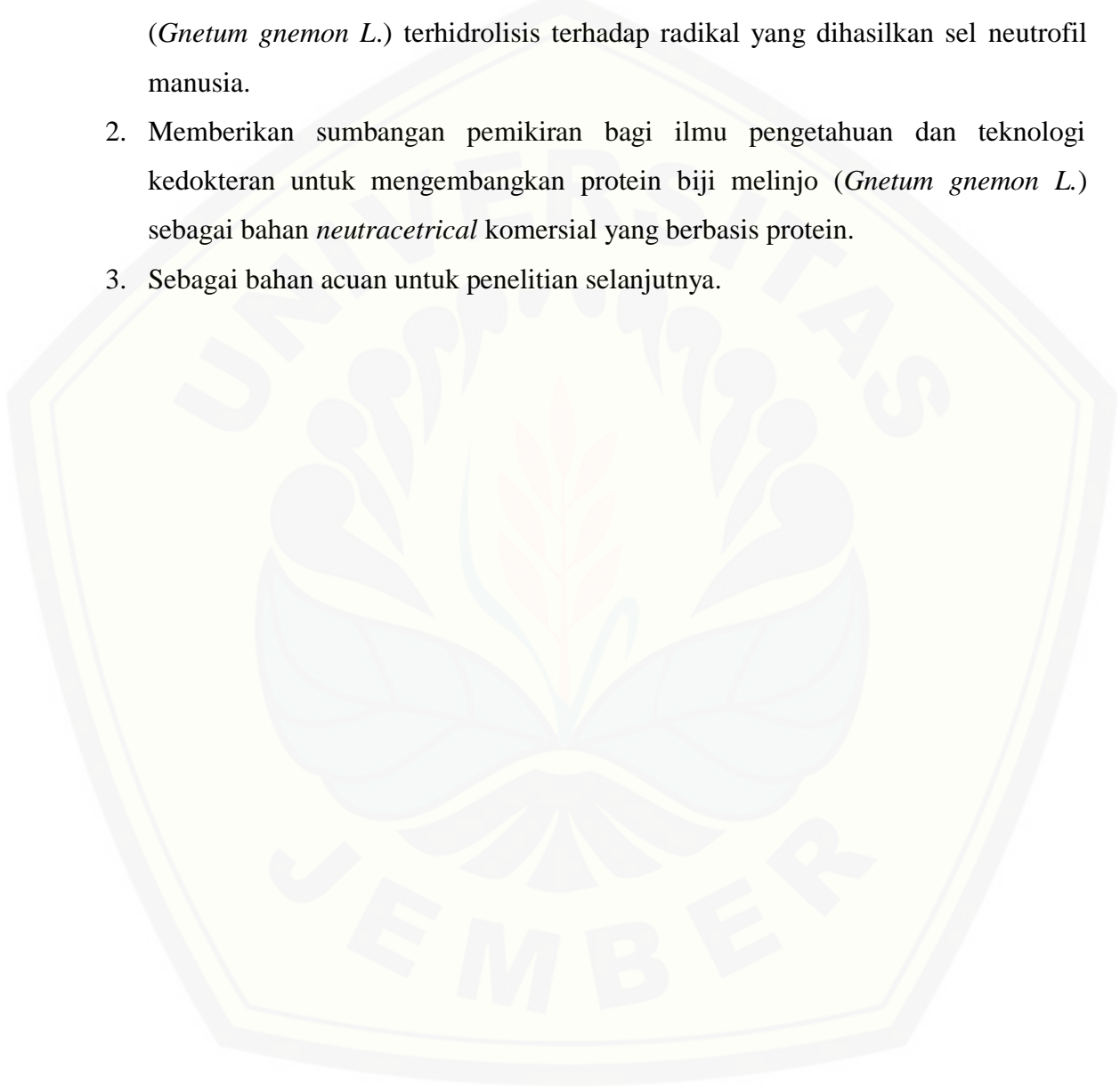
1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) (*Gnetum gnemon Linn*) terhadap radikal superoksida neutrofil dan mengkaji perbedaan aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) terhadap radikal superoksida neutrofil yang diinkubasi selama 1 jam dan 18 jam.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Meningkatkan pemahaman tentang aktivitas antioksidan protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhidrolisis terhadap radikal yang dihasilkan sel neutrofil manusia.
2. Memberikan sumbangan pemikiran bagi ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran untuk mengembangkan protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) sebagai bahan *neutraceutical* komersial yang berbasis protein.
3. Sebagai bahan acuan untuk penelitian selanjutnya.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas Superoksida

Radikal bebas adalah atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada lapisan terluarnya (Clarkson, 2000). Radikal bebas memiliki sifat reaktivitas yang tinggi karena kecenderungannya menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal (Suryohudoyo, 2010). Sifat lain radikal bebas adalah bereaksi cepat dengan atom lain untuk mengisi orbitalnya yang tidak berpasangan, sehingga hanya dapat berdiri sendiri dalam periode singkat sebelum menyatu dengan atom lain (Simanjuntak, 2007).

Radikal bebas dapat dihasilkan secara endogen dari reaksi reduksi oksidasi selama proses fisiologi normal dalam tubuh, maupun eksogen yaitu dari luar tubuh seperti paparan asap rokok, radiasi ionisasi, dan polutan lain. Salah satu mekanisme penghasil radikal bebas endogen adalah melalui respirasi fosforilasi oksidatif, reaksi pembentukan adenosine trifosfat (ATP) sebagai energi, dalam matriks mitokondria. Pada saat proses tersebut berlangsung terjadi kebocoran elektron dari rantai pernapasan sehingga terbentuklah senyawa oksigen reaktif yang berbahaya. Mekanisme penghasil radikal bebas endogen lainnya adalah melalui *respiratory burst* neutrofil, dimana terbentuk senyawa oksigen reaktif untuk membunuh bakteri (Widayati, 2012).

Radikal bebas dapat dikelompokkan dalam spesies oksigen reaktif (ROS/*Reactive Oxygen Species*) dan spesies nitrogen reaktif (RNS/*Reactive Nitrogen Species*). ROS diperoleh melalui proses penambahan maupun reduksi molekul oksigen (O_2), contohnya radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH^\bullet). Salah satu RNS yang paling reaktif adalah nitrit oksida (NO),

yang dihasilkan oleh berbagai sel dan jaringan dengan bantuan enzim *nitric oxide synthase* (NOS). Reaksi antara radikal superoksida dengan NO akan memproduksi peroksinitrit. Peroksinitrit merupakan molekul yang lebih reaktif dibandingkan radikal peroksida dan NO karena menyebabkan peroksidasi lipid, penghambatan transport elektron mitokondria, oksidasi komponen thiol, dan juga mempunyai aktivitas pemotongan DNA yang poten (Amirudin, 2004). Tipe radikal bebas dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Tipe radikal bebas

Tipe	Radikal Bebas	Non radikal
ROS (<i>Reactive Oxygen Species</i>)	Radikal superoksida $\rightarrow O_2^-$	Oksigen tunggal $\rightarrow {}^1O_2$
	Radikal hidroksil $\rightarrow OH^\bullet$	Hidrogen peroksida $\rightarrow H_2O_2$
	Radikal peroksil $\rightarrow ROO^\bullet$	Asam hipoklorus $\rightarrow HOCl$
RNS (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)	Nitrit oksida $\rightarrow NO$	Peroksinitrit $\rightarrow ONOO^-$
	Nitrogen dioksida $\rightarrow NO_2^-$	Nitrous oksida $\rightarrow HNO_2$

Sumber: Amirudin (2004)

Radikal bebas yang diproduksi dalam jumlah normal penting untuk fungsi biologis, seperti mekanisme oksidatif neutrofil untuk membunuh bakteri (Droge, 2002). Namun, radikal bebas tidak menyerang sasaran spesifik, ia juga akan menyerang protein, DNA, dan asam lemak tidak jenuh ganda dari membran lipid sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Marks, 2000; Winarsi, 2007).

Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas ini, hanya saja bila jumlahnya melebihi kemampuan antioksidan seluler maka akan merusak sel itu sendiri. Selain itu, reaktivitas radikal bebas yang tinggi dan kecenderungannya untuk membentuk radikal baru lagi jika bertemu dengan molekul lain menyebabkan terbentuknya rantai reaksi (*chain reaction*) (Suryohudoyo, 2010). Kerusakan sel dan *chain reaction* tersebut berbahaya karena dapat menyebabkan stres oksidatif yang menyebabkan

berbagai penyakit seperti diabetes, aterosklerosis, neurodegeneratif, penuaan dini, periodontitis, dan berbagai penyakit lainnya (Droge, 2002; Chapple, 2007).

Pengertian radikal bebas (*free radicals*) dan oksidan sering kali dibaurkan karena keduanya memiliki sifat-sifat yang mirip. Aktivitas kedua jenis senyawa ini prosesnya berbeda namun sering menghasilkan akibat yang sama. Oksidan merupakan senyawa penerima elektron (*electron acceptor*), yaitu senyawa-senyawa yang dapat menarik elektron, sedangkan radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dan cenderung untuk menarik elektron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal baru. Sifat radikal bebas yang mirip dengan oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron. Oksidan dan radikal bebas adalah penerima elektron. Radikal bebas adalah oksidan, tetapi tidak setiap oksidan adalah radikal bebas (Suryohudoyo, 2010).

Radikal bebas lebih berbahaya dibandingkan oksidan yang bukan radikal. Hal ini disebabkan oleh kedua sifat radikal bebas, yaitu reaktifitas yang tinggi dan kecenderungannya membentuk radikal baru, jika bertemu molekul lain akan membentuk radikal baru lagi, sehingga terjadilah rantai reaksi (*chain reaction*) yang menyebabkan stres oksidatif sumber berbagai penyakit (Suryohudoyo, 2010).

2.1.1 *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Radikal bebas terpenting dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species* atau ROS) (Halliwell & Whiteman, 2004). ROS adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif, dihasilkan melalui reduksi satu elektron yang terdiri dari kelompok radikal bebas dan nonradikal (Simanjuntak, 2007). Derivat oksigen radikal meliputi radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil ($OH\bullet$), radikal peroksil ($ROO\bullet$), sedangkan derivat oksigen yang non radikal seperti oksigen tunggal (singlet/ 1O_2),

bentuk oksigen yang tereduksi secara parsial yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2), dan asam hipoklorus ($HOCl$) (Araujo, 1998; Varh, 2010).

ROS dapat dihasilkan melalui jalur metabolisme tubuh normal seperti respirasi seluler dimana terjadi kebocoran elektron sehingga menghasilkan radikal bebas atau disintesis oleh enzim seperti NADPH oksidase dan mieloperoksidase yang bekerja dalam *respiratory burst* selama fagositosis oleh sel neutrofil dan makrofag untuk menghancurkan antigen atau organisme asing. ROS juga dapat dihasilkan dari pengaruh luar tubuh seperti paparan asap rokok, radiasi ionisasi sinar X dan gamma (Widayati, 2012).

2.1.2 Radikal Superoksida

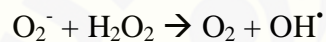
Radikal superoksida (O_2^-) dapat dibentuk dari reduksi univalen molekul oksigen yang dimediasi oleh enzim NADPH oksidase dalam *respiratory burst* dan reaksi oksidasi *hypoxanthine* dan *xanthine* yang dikatalisis oleh metalloenzim xanthine oksidase. Reduksi univalen molekul oksigen pembentuk O_2^- juga dapat dimediasi secara nonenzimatis oleh senyawa reaktif redoks seperti semi-ubiquinone dari rantai transport elektron mitokondria (Levine *et al.*, 2001; Droge, 2002; Soares, 2009).

Radikal superoksida sangat reaktif, radikal ini dapat berperan dalam penyakit kardiovaskuler seperti hipertensi dengan mempengaruhi fungsi endotel melalui reaksi dengan nitrit oksida (NO), yang merupakan vasodilator endogen, membentuk peroksinitrit ($ONOO^-$). Pengikatan NO menyebabkan konsentrasi NO berkurang sehingga menyebabkan vasokonstriksi pembuluh darah dan $ONOO^-$ yang terbentuk merupakan oksidan kuat yang mempunyai efek merusak (McIntyre, 1999).

Radikal superoksida juga dapat menghasilkan reaktif oksigen lainnya seperti hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH^\bullet) yang lebih reaktif (Marks, 2000). Hidrogen peroksida dihasilkan dari penambahan satu elektron pada O_2^-

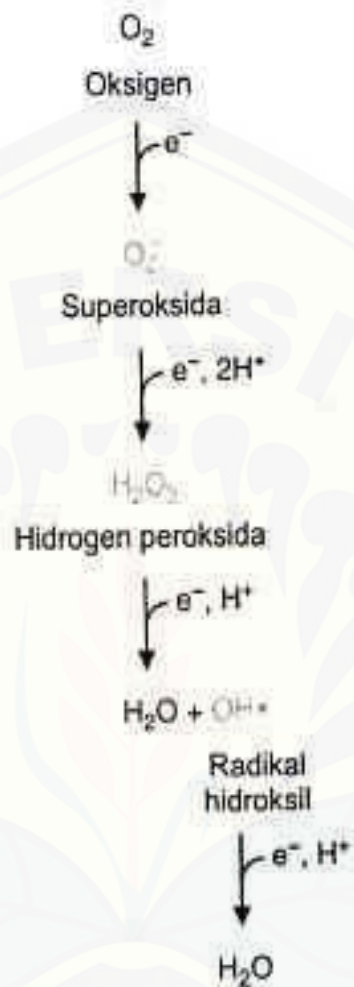
melalui aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD). Hidrogen peroksida ini berbahaya karena dapat merusak membran sel sehingga terdapat beberapa enzim yang dapat menetralkannya, seperti enzim katalase dan glutathion peroksidase (GSH-Px) yang mengubah H_2O_2 menjadi H_2O (Sudiana, 2008). Radikal superoksida dapat bereaksi dengan H_2O_2 untuk menghasilkan OH^\bullet , yang merupakan ROS paling reaktif, melalui reaksi Haber-Weiss. Hidrogen peroksida juga dapat menghasilkan OH^\bullet dari logam transisi tereduksi seperti *ferrous* (Fe^{2+}) atau *cuprous* (Cu^+) melalui reaksi Fenton (Marks, 2000). Proses reduksi satu elektron pembentuk radikal superoksida dan derivatnya dapat dilihat pada Gambar 2.1.

1. Reaksi Haber-Weiss



2. Reaksi Fenton





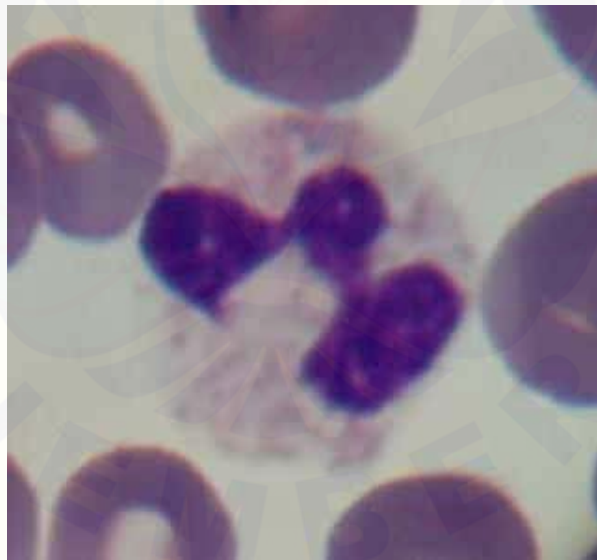
Gambar 2.1 Proses reduksi satu elektron pada oksigen yang menghasilkan radikal superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil (Marks, 2000).

2.2 Neutrofil

Granulosit dalam sirkulasi darah manusia terdiri dari tiga macam sel yang secara morfologis dapat dibedakan dan ikut terlibat dalam reaksi imunologik jaringan, yaitu sel neutrofil, basofil, dan eosinofil. Dari ketiga macam sel tersebut, neutrofil merupakan sel utama yang memiliki fungsi fagositosis dan merupakan jenis

leukosit terbanyak dalam sirkulasi darah yang berperan pada reaksi inflamasi akut (Bharatawidjaja, 2004; Susilawati, 2008). Neutrofil atau *polymorphonuclear neutrophilic leukocyte* (PMN) adalah leukosit granular matur polimorfonuklear yang memiliki inti tiga hingga lima lobus dan sitoplasma yang mengandung granula halus (Dorland, 2006), seperti terlihat pada Gambar 2.2. Neutrofil berjumlah 60-70% dari jumlah leukosit dalam darah perifer orang dewasa (Guyton & Hall, 2008).

Neutrofil mengandung sedikitnya dua tipe granula yaitu granula azurofil atau primer dan granula sekunder atau spesifik. Granula azurofil mengandung enzim lisosom, enzim mieloperoksidase (MPO) serta enzim hidrolitik lain, sedangkan granula spesifik mengandung laktoferin serta beberapa enzim salah satunya kolagenase. Kedua macam granula ini penting dalam penghancuran mikroorganisme dan benda asing yang ditelan (Jawetz, 2005).



Gambar 2.2 Sel neutrofil yang dikelilingi eritrosit, pembesaran 1000x (Gaut, 2001)

2.2.1 Fungsi Neutrofil

Neutrofil merupakan fagosit pertama yang berperan dalam reaksi inflamasi akut (Bharatawidjaja, 2004). Tugas utama neutrofil adalah melakukan fungsi fagositosis dan penghancuran benda asing atau mikrobia melalui mekanisme oksidatif dan mekanisme nonoksidatif. Mekanisme oksidatif diperankan oleh ROS seperti O_2^- , H_2O_2 , dan OH^\bullet , sedangkan mekanisme nonoksidatif diperankan oleh enzim-enzim pencernaan (Kirkwood, 2006).

Mekanisme fagositosis diawali dengan perlekatan neutrofil ke partikel yang akan difagosit, kemudian sel ini menonjolkan pseudopodia ke sekeliling partikel. Pseudopodia bertemu satu sama lain pada sisi yang berlawanan dan bergabung, sehingga tercipta ruangan tertutup yang berisi partikel yang sudah difagositosis. Ruangan ini berinvaginasi ke dalam rongga sitoplasma dan melepaskan diri dari membran sel bagian luar untuk membentuk fagosom di dalam sitoplasma (Guyton & Hall, 2008).

Mekanisme nonoksidatif melibatkan enzim lisosom dan granula sitoplasmik lainnya. Lisosom dan granula sitoplasmik ini menggabungkan membrannya dengan membran fagosom, kemudian mengeluarkan banyak enzim pencernaan dan bahan bakterisidal ke dalam fagosom, sehingga dimulailah proses pencernaan bakteri yang sudah difagosit (Guyton & Hall, 2008).

Mekanisme oksidatif merupakan mekanisme mikrobisidal utama pada neutrofil (Susilawati, 2008). Mekanisme ini diperankan oleh beberapa bahan pengoksidasi kuat yang dibentuk oleh enzim dalam membran plasma dan fagosom, atau oleh organel khusus yang disebut peroksisom. Bahan pengoksidasi ini merupakan sejumlah besar superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil (OH^\bullet) yang dapat membunuh sebagian besar bakteri, bahkan bila enzim lisosomal gagal mencerna bakteri tersebut. Bahan-bahan ini dalam jumlah sedikit sudah bersifat mematikan untuk sebagian besar bakteri. Selain itu, salah satu enzim lisosom yaitu MPO memiliki fungsi mengatalisis reaksi antara H_2O_2 dan ion klorida

untuk membentuk hipoklorit (HOCl) yang secara luas bersifat bakterisidal (Guyton & Hall, 2008).

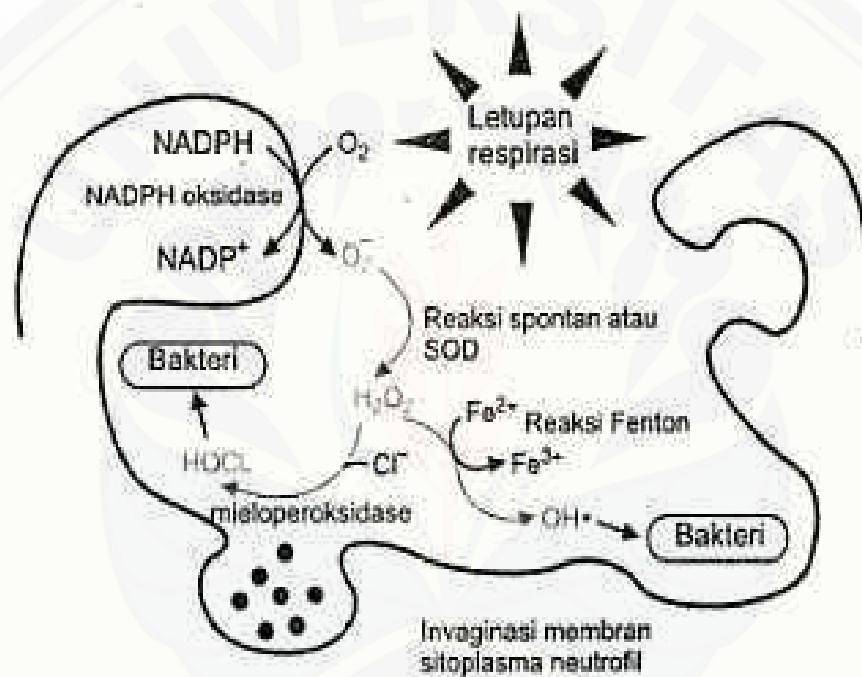
2.2.2 *Respiratory Burst* Neutrofil

Respiratory burst adalah peningkatan konsumsi oksigen neutrofil pada saat fagositosis bakteri yang merupakan salah satu sistem antimikrobal fagosit utama (Dahlgren, 1999). Peningkatan konsumsi oksigen mencapai 10 sampai 20 kali lipat dibandingkan saat neutrofil tidak terstimulasi (Gough, 2006). *Respiratory burst* ini dapat dipicu oleh partikel yang teropsonisasi yang mengaktifkan reseptor $Fc\gamma$ ($Fc\gamma R$), DNA bakteri yang dapat mengaktifkan TLR-4 dan TLR-9, peptida kecil dari bakteri seperti *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine* (fMLP), dan agonis protein kinase C seperti *phorbol myristate acetate* (PMA) (Chapple, 2007; Susilawati, 2008).

Mekanisme antimikrobal oksidatif pada neutrofil yang melibatkan ROS terbagi menjadi dua jalur utama yaitu, sistem *nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) oksidase dan enzim mieloperoksidase (MPO). Sistem NADPH oksidase mentransport elektron dari NADPH sitosol melewati membran plasma atau membran fagosom untuk mereduksi oksigen (O_2) menjadi radikal superoksida (O_2^-) yang bersifat bakterisidal. Enzim MPO berfungsi untuk mengkatalisis reaksi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan ion klorid untuk membentuk hipoklorit (HOCl) yang dapat membunuh bakteri (Clark, 1999; Forman, 2002).

NADPH oksidase dibentuk dan diaktifkan baik di membran plasma yang mengandung sekitar 5% sitokrom b, membran fagosom, maupun membran dari granula intra seluler bergerak yang mengandung sekitar 95% sitokrom b. Komponen sistem NADPH oksidase terdiri dari membran terikat dan protein sitosol terlarut. NADPH oksidase teraktivasi ketika terjadi translokasi dari protein sitosol ke membran terikat sitokrom b_{558} yang dikatalisis oleh enzim *flavocytochrome*. Fungsi kompleks ini secara keseluruhan adalah sebagai sistem transport elektron, yang

mentransport elektron dari NADPH sitosol ke molekul oksigen untuk membentuk O_2^- bersama dengan produk reaktif berikutnya, yang bersifat bakterisidal dan sitotoksik. Superoksida dan produk sekundernya berakumulasi di ruangan ekstra seluler untuk membunuh mikroba atau di fagosom untuk membunuh mikroorganisme yang terfagosit (Clark, 1999; Dahlgren, 1999). Pembentukan ROS selama *respiratory burst* dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Pembentukan ROS selama *respiratory burst* oleh neutrofil. Pengaktifan NADPH oksidase mencetuskan *respiratory burst* disertai pembentukan radikal superoksida. Selama fagositosis, membran plasma membentuk invaginasi, sehingga radikal superoksida dibebaskan ke dalam ruang vakuol. Anion superoksida (baik secara spontan atau secara enzimatis melalui SOD) menghasilkan spesies reaktif lain, termasuk H_2O_2 dan radikal hidroksil. Mieloperoksidase, suatu enzim yang mengandung Fe-hem dan terdapat di dalam granula neutrofil, disekresikan ke dalam vakuol, tempat enzim tersebut membentuk HOCl dan halida lainnya. Hasilnya adalah serangan terhadap membran dan senyawa lain dari sel bakteri, dan akhirnya lisis bakteri. Proses keseluruhan disebut sebagai ledakan pernapasan karena hanya berlangsung 30-60 menit, dan memerlukan O_2 (Marks, 2000).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dalam konsentrasi rendah dapat menstabilkan radikal bebas dengan mendonorkan elektronnya dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas baru tanpa merubah fungsinya (Simanjuntak, 2007). Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stres oksidatif (Chapple, 2007). Menurut Valko (2006), antioksidan berperan dengan cara:

- a. mengkatalisis radikal bebas oleh enzim superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase (GSH-Px)
- b. mengikat prooksidan (ion Fe, Cu, dan hem), contohnya transferrin, haptoglobin, hemopeksin, dan seruloplasmin
- c. membersihkan ROS oleh antioksidan dari senyawa-senyawa dengan berat molekul rendah seperti glutathion tereduksi (GSH), asam askorbat (vitamin C), bilirubin, α -tokoferol (vitamin E), dan asam urat.

Menurut Simanjuntak (2007), berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi menjadi dua yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen adalah antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh yang terdiri dari antioksidan enzimatis seperti SOD, GSH-Px, serta katalase, dan antioksidan non enzimatis seperti transferrin (Elias, 2008; Valko, 2006). Antioksidan eksogen adalah antioksidan yang bersumber dari luar tubuh seperti senyawa-senyawa flavonoid, vitamin C, vitamin E, dan karotenoid (Simanjuntak, 2007).

Menurut Chapple (2007), antioksidan juga dapat diklasifikasikan menurut fungsinya, yaitu sebagai antioksidan preventif dan antioksidan *scavenging* (pemutus rantai). Contoh antioksidan preventif adalah kelompok enzim seperti SOD, katalase, GSH-Px, enzim DNA repair seperti poly(ADP-ribose) polimerase, dan penyerap ion logam seperti albumin, laktoferin, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, hemopexin, karotenoids, SOD, katalase, GSH-Px, glutathion reduktase, asam urat, polifenol flavenoids. Antioksidan pereventif pada dasarnya mencegah terbentuknya

radikal hidroksil dengan penghapusan enzimatik radikal superoksida dan hidrogen peroksida atau dengan pengikatan atau penyitaan ion metal transisi prooksidatif sehingga mencegah reaksi Fenton. Antioksidan scavenging (pemutus rantai) terdiri dari askorbat, karotenoids (termasuk retinol-vitamin A), asam urat, α -tokoferol, polifenol (flavenoids), bilirubin, albumin, ubiquinone tereduksi, dan thiols. Antioksidan *scavenging* bekerja dengan penyumbangan elektron sehingga radikal bebas menjadi stabil dan reaksi berantai dapat terhenti.

Kemampuan protein untuk berinteraksi dengan radikal bebas telah banyak diteliti. Dua puluh asam amino yang ditemukan dalam protein memiliki potensi untuk berinteraksi dengan radikal bebas. Protein memiliki potensi sebagai antioksidan karena dapat menginaktivasi ROS, *scavenging* radikal bebas, pengikatan atau penyitaan logam transisi prooksidatif (menjauhkan logam dari lipid yang rentan teroksidasi dan hidrogen peroksida, membentuk kompleks logam tidak larut, mengurangi reaktivitas kimia dari logam transisi), dan reduksi hidrogen peroksida (Elias, 2008; Ostdal, 2002).

Aktivitas antioksidan protein dapat ditingkatkan dengan merubah konsentrasi, reaktivitas, dan struktur fisik. Banyak mekanisme antioksidan protein bergantung pada komposisi asam amino, namun aktivitas antioksidan asam amino residu ini dibatasi oleh struktur tersier dari polipeptida karena banyak asam amino dengan potensi antioksidan berada dalam inti protein dimana mereka tidak dapat diakses oleh prooksidan. Oleh karena itu, asam amino tidak mungkin untuk memiliki aktivitas radikal bebas yang kuat ketika protein tersebut dalam keadaan *native* atau aslinya (Elias, 2008).

Salah satu pendekatan untuk meningkatkan aktivitas antioksidan protein adalah melalui gangguan stuktur tersier atau denaturasi protein, yang berpotensi meningkatkan aksesibilitas kelarutan dari residu asam amino oksidatif. Denaturasi protein ini dapat dilakukan dengan hidrolisis enzimatik (Hernandez, 2005; Diaz et al, 2005). Peningkatan aktivitas antioksidan setelah dihidrolisis terjadi karena adanya

peningkatan paparan terhadap asam amino yang larut, sehingga reaksi radikal bebas dengan peptida meningkat (Park, 2005; Sakanaka, 2006). Hidrolisis protein juga meningkatkan kemampuan peptida untuk mengurangi energi radikal bebas yang ditangkap sehingga mengurangi kemampuan radikal bebas ini untuk mengoksidasi makromolekul seperti lipid (Elias, 2008). Peningkatan aktivitas antioksidan peptida setelah hidrolisis berupa meningkatnya kapasitas penyitaan logam transisi (Elias, 2006; Wang, 2005) dan aktivitas *scavenging* terhadap radikal bebas (Kong & Xiong, 2006; Rival *et al.*, 2001)

2.4 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tumbuhan asli Indo-Malaya, termasuk keluarga Gnetacea, yang banyak dibudidayakan di Indonesia (Kato, 2009). Melinjo termasuk tumbuhan berbiji terbuka (*Gymnospermae*), tidak terbungkus daging buah tetapi hanya terbungkus kulit luar. Buah tumbuhan melinjo bukan buah sejati, tetapi yang dianggap buah adalah bijinya (Hanan & Sutrisno, 2000; Tjitrosoepomo, 2004).

Daerah distribusi tumbuhan ini di Indonesia meliputi Pulau Sumatera, Jawa, Sumba, dan Sulawesi. Selain di Indonesia, tumbuhan ini juga dapat ditemukan di Malaysia, Filipina, Kamboja, Vietnam, Thailand, Papua Nugini, Cina, Fiji, dan India, Assam, Semenanjung Malaysia, Pulau Solomon, dan Vanuatu (Cadiz & Florido, 2001; Lim, 2012; Manner & Elevitch, 2006; Orwa *et al.*, 2009). Tumbuhan melinjo dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Buah Melinjo (*Gnetum gnemon L.*)
(Tampubolon, 2013)

2.4.1 Klasifikasi Tumbuhan Melinjo

Menurut Tjitrosoepomo, G (2004), klasifikasi tumbuhan melinjo sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Gymnospermae
Kelas	: Gnetinae
Ordo	: Gnetales
Famili	: Gnetaceae
Genus	: <i>Gnetum</i>
Spesies	: <i>Gnetum gnemon L.</i>

2.4.2 Morfologi Tumbuhan Melinjo

Melinjo adalah tumbuhan kecil menengah dengan tinggi 10–15 meter dan diameter hingga 40 cm. Batangnya silinder dengan banyak cabang, mahkota

berbentuk kompak sampai kerucut. Daun melinjo berhadapan, berbentuk jorong, runcing pada kedua ujungnya, urat daun sekunder saling bersambungan, warna hijau tua, panjang 10-20 cm, dan lebar 4-7 cm. Perakaran melinjo adalah tunggang dan berwarna coklat. Perbungaan majemuk soliter dan aksiler, melingkar di tiap nodus, panjang bunga 3-6 cm. Buah seperti buah kacang, berbentuk jorong, bagian ujungnya runcing pendek dengan panjang 2,3-3,5 cm. Ketika masak warna buah berangsur-angsur akan berubah dari kuning, merah hingga keunguan (Cadiz & Florido, 2001; Tjitrosoepomo, 2004).

2.4.3 Habitat Tumbuhan Melinjo

Melinjo tumbuh subur di daerah tropis, kering sampai lembab di ketinggian rendah dan menengah (0 – 1.200 mdpl). Tumbuhan ini tumbuh dengan baik di daerah dengan curah hujan tahunan 3.000-5.000 mm merata sepanjang tahun atau musiman dan suhu tahunan 22-30⁰C, meskipun juga dapat bertahan hidup pada curah hujan tahunan 750-1.000 mm (Cadiz & Florido, 2001; Lim, 2012). Melinjo tidak memerlukan tanah yang bernutrisi tinggi atau iklim khusus untuk tumbuh dan berkembang (Mulyanto, 1995; Tampubolon, 2013). Melinjo dapat tumbuh di jenis tanah yang beragam seperti berpasir, tanah liat, lempung sampai tanah berkapur, tetapi lebih subur pada tanah yang relatif netral dengan drainase yang baik (Cadiz & Florido, 2001).

2.4.4 Manfaat Tumbuhan Melinjo

Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) merupakan salah satu tumbuhan tahunan yang mempunyai potensi cukup besar untuk dikembangkan. Kayu melinjo dapat dipakai sebagai bahan papan dan alat rumah tangga sederhana. Daun-daun muda, bunga, dan bijinya yang masih muda maupun yang sudah masak dapat diolah menjadi sayuran

(Tjitrosoepomo, 2004; Manner & Elevitch, 2006). Bagian terpenting dari melinjo adalah bijinya. Biji melinjo dapat dimakan kering, dimasak, atau diolah sebagai bahan baku pembuatan emping. Pohon melinjo memiliki perakaran yang kuat sehingga baik ditanam untuk pemulihan kembali areal kritis sehingga direkomendasikan sebagai tanaman penghijauan (Tambupolon, 2013).

2.4.5 Kandungan Kimia Melinjo

Melinjo merupakan tumbuhan yang mengandung banyak komponen aktif yang berfungsi sebagai antimikroba (Kato, 2007). Senyawa bioaktif melinjo seperti saponin, tanin, flavonoid terdapat pada daun dan bijinya, selain itu biji melinjo juga mengandung stillbenoids (Hariana, 2008; Kato, 2009; Parhusip, 2011). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam kulit melinjo adalah fenolik, flavonoid, tanin, steroid, likopen, vitamin C, dan β -karoten. Komponen fenolik, flavonoid, saponin, tanin, stillbenoids, dan steroid termasuk ke dalam golongan senyawa antimikroba (Parhusip, 2011).

Melinjo mengandung senyawa antioksidan yang cukup tinggi, sehingga sangat reaktif terhadap radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa biji melinjo mengandung senyawa polifenol yang disebut resveratrol (Mori, 2008). Melinjo resveratrol memiliki aktivitas antibakteri dan antioksidan (Hisada *et al.*, 2005). Biji melinjo juga mengandung senyawa gnetonoside yang merupakan salah satu golongan stilbenoid yang berperan sebagai senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas (Santoso, 2010).

Kandungan protein tinggi dalam biji melinjo juga memiliki potensi aktif sebagai antioksidan, dengan aktivitas setara dengan vitamin C. Aktivitas antioksidan ini diperoleh dari konsentrasi protein tinggi yaitu 9-11% dalam tiap biji melinjo (Siswoyo *et al.*, 2011). Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa protein biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase memiliki kemampuan antioksidan.

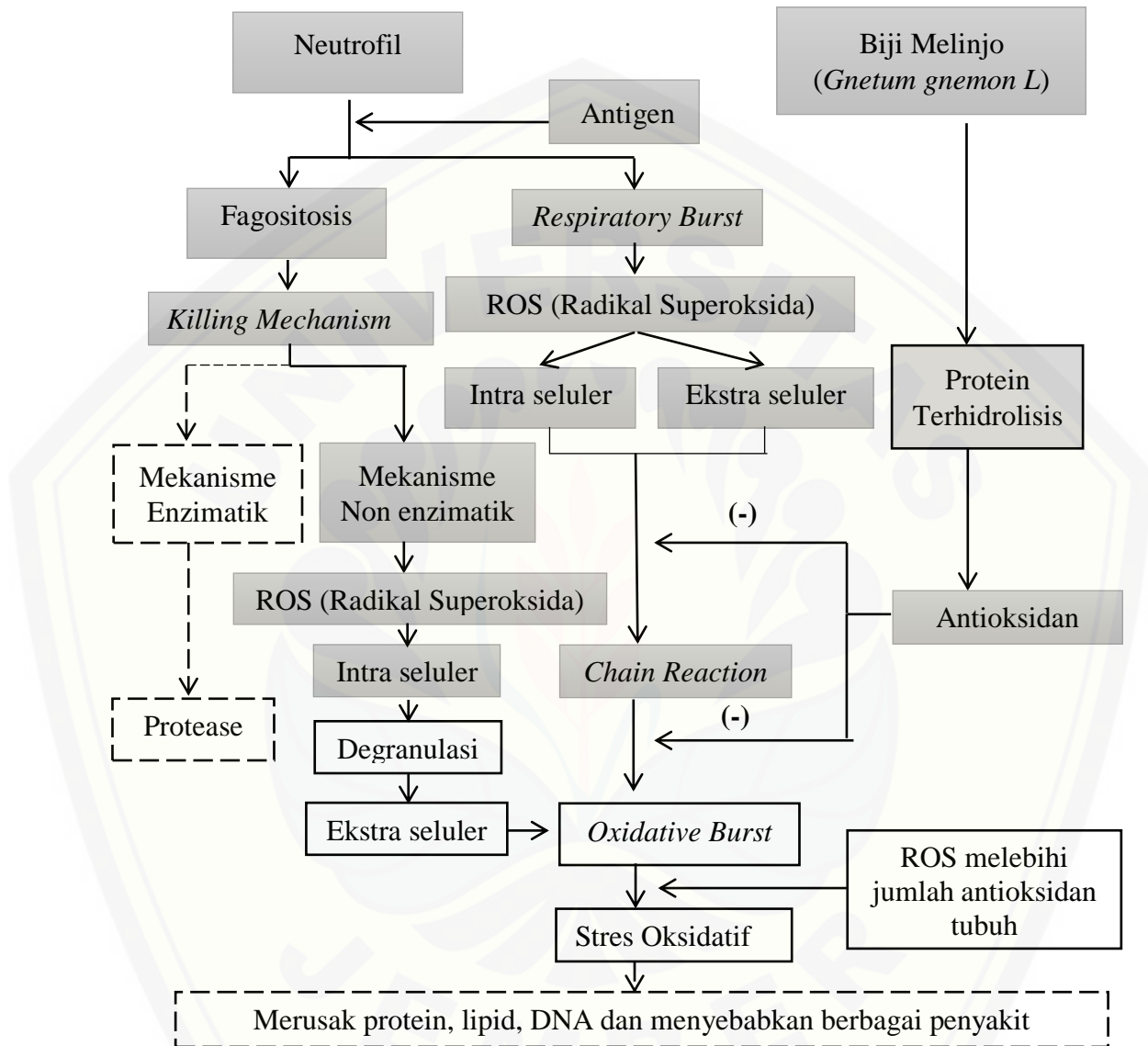
Protein utama biji melinjo berukuran 30 kD efektif untuk meredam radikal bebas penyebab berbagai penyakit (Siswoyo *et al*, 2012). Melinjo memiliki banyak kandungan gizi yang bermanfaat bagi tubuh. Kandungan gizi biji melinjo dapat dilihat pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Kandungan gizi biji melinjo (100 gr)

Kandungan Unsur Gizi	Biji Melinjo (100 gr)
Kalori	66 cal
Protein	5 gr
Lemak	0,7 gr
Karbohidrat	13,3 gr
Kalsium	163 mg
Fosfor	75 mg
Besi	2,8 mg
Vitamin A	1000 SI
Vitamin B1	0,10 mg
Air	80 gr

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI (1996)

2.5 Kerangka Konsep



Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian. Neutrofil yang terstimulasi oleh antigen akan menginduksi terjadinya *respiratory burst* dan aktivitas fagositik baik secara enzimatik maupun oksidatif. Aktivitas fagositik oksidatif dan *respiratory burst* menyebabkan neutrofil memproduksi radikal superoksida, yang dapat merusak protein, lipid, DNA, memicu terjadinya reaksi berantai (*chain reaction*) jaringan, dan stres oksidatif sehingga menyebabkan berbagai penyakit. Produksi radikal superoksida dapat ditekan menggunakan antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH). Protein Gg-PH diharapkan mampu berperan sebagai antioksidan terhadap radikal superoksida neutrofil, sehingga kerusakan lipid, protein, DNA yang menyebabkan berbagai penyakit dapat dicegah.

2.6 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan tinjauan pustaka yang telah dikemukakan, hipotesis penelitian ini adalah protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) dapat meredam produksi radikal superoksida neutrofil dan terdapat perbedaan antara aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil yang diinkubasi selama 1 jam dan 18 jam.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Penelitian eksperimental laboratoris memiliki tujuan menyelidiki kemungkinan sebab akibat dengan cara mengadakan intervensi atau mengenakan perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen, kemudian hasil dari perlakuan tersebut dibandingkan dengan kelompok yang tidak dikenakan perlakuan (kelompok kontrol) (Notoatmodjo, 2005).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2015-Januari 2016 di dua tempat yakni, (1) *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember untuk hidrolisis protein biji melinjo, uji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) terhadap radikal ABTS dan pirogalol, (2) Laboratorium *Biosciences* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember untuk uji aktivitas antioksidan Gg-PH pada superoksida neutrofil.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Posttest Only Control Group Design*. Jenis rancangan penelitian ini adalah memilih kelompok penelitian yang dilakukan secara random, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

Kelompok perlakuan dilakukan intervensi dan kelompok kontrol tidak, setelah itu dilakukan pengukuran *posttest* dan membandingkan kedua kelompok (Hidayat, 2010).

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH).

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH).

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah:

1. Konsentrasi protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH)
2. Jenis dan konsentrasi sel neutrofil
3. Dosis perlakuan ABTS, pirogallol, dan fMLP
4. Prosedur laboratoris

3.5 Definisi Operasional

1. Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) adalah protein biji melinjo yang sudah melalui proses purifikasi dan hidrolisis protein oleh enzim alkalase selama 5 jam, dengan konsentrasi, dan derajat hidrolisis tertentu serta sudah diuji aktivitas antioksidannya terhadap radikal bebas secara umum dengan

metode ABTS dan radikal superoksida dengan metode Autooksidasi Pirogalol.

2. Aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) adalah berkurangnya produksi radikal superoksida karena kemampuan mengikat dan meredam radikal bebas dari Gg-PH yang dideteksi menggunakan metode *Nitro Blue Tetrazoloum* (NBT). Aktivitas antioksidan Gg-PH intra seluler diamati secara mikroskopis yaitu berkurangnya jumlah neutrofil yang bergranula biru, sedangkan ekstra seluler diamati secara spektrofotometri yaitu berkurangnya nilai absorbansi medium neutrofil.

3.6 Objek Penelitian

Objek yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat neutrofil yang diisolasi dari darah vena peripheral orang sehat. Isolasi neutrofil menggunakan metode *double ficoll hypaque centrifugation* (Andersen, 1974).

Neutrofil diisolasi dari darah yang berasal dari volunteer dengan kriteria sebagai berikut:

1. Orang sehat yang tidak memiliki riwayat kelainan darah serta penyakit sistemik berdasarkan hasil anamnesa, dan *vital sign* normal.
2. Tidak merokok
3. Telah mengisi *informed consent* sebagai bukti persetujuan bahwa darah yang diambil akan dijadikan sampel penelitian.

3.6.1 Kelompok Penelitian

Terdapat 3 kelompok dalam penelitian yaitu: (1) neutrofil yang dipapar protein Gg-PH (kelompok Gg-PH), (2) neutrofil yang dipapar protein antioksidan GSH sebagai kontrol positif (kelompok GSH), dan (3) neutrofil yang dipapar antigen

fMLP sebagai kontrol negatif (kelompok FMLP). Penelitian pendahuluan menunjukkan produksi radikal superoksida neutrofil yang dipapar antigen FMLP pada inkubasi selama 1,2, dan 3 jam belum terlihat secara visual di *well plate* (Lampiran N, hal. 115), sedangkan menurut Choi (2006) neutrofil yang dipapar antigen FMLP dan diinkubasi selama 60 menit akan memproduksi radikal superoksida yang dapat dilihat secara visual. Berdasarkan hal tersebut diatas maka pada penelitian ini masing-masing kelompok dilakukan inkubasi selama 1 jam dan 18 jam, sebagai berikut:

Tabel 3.1 Kelompok penelitian aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil (uji NBT)

Kelompok	Perlakuan	Inkubasi
FMLP 1 jam	Neutrofil + antigen fMLP	1 Jam
FMLP 18 Jam	Neutrofil + antigen fMLP	18 Jam
GSH 1 jam	Neutrofil + antigen fMLP + GSH	1 Jam
GSH 18 jam	Neutrofil + antigen fMLP + GSH	18 Jam
Gg-PH 1 Jam	Neutrofil + antigen fMLP + Gg-PH	1 Jam
Gg-PH 18 Jam	Neutrofil + antigen fMLP + Gg-PH	18 Jam

Pada penelitian ini juga dilakukan uji neutrofil tanpa perlakuan antigen fMLP (inkubasi *only* 1 jam dan 18 jam) dan tanpa perlakuan antigen fMLP serta inkubasi (kelompok pra inkubasi) dengan maksud mengetahui produksi radikal superoksida tanpa mendapat perlakuan antigen dan inkubasi (Lampiran I hal. 68 dan J hal. 96).

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Centifuse (Hitachi CF15RXII, Hitachi CR21GIII, dan Eppendorf 5810 R), inkubator (Carbolite), inkubator CO₂, mikroskop *inverted*, mikroskop binokuler, *microplate reader*, *Opti Lab*, Spektrofotometer (Mapada V1100D dan Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), *dry block heater*, *water bath*, *autoclave*, *laminar flow*, ruang asam,

well plate 12, well plate 96, micro filter 0,2 µm, oven, blender, freezer, neraca digital (Precisa dan ES-225SM-DR), pH meter, vortex, stirer, eppendorf, tabung reaksi, siringe 5 mL, tabung heparin, bulb pipette, gelas ukur, beaker glass, tabung falcon, pipette, micro pipette, cover glass, tourniquet, white, yellow, and blue tip, masker, sarung tangan, dan alat pendukung lainnya.

3.7.2 Bahan Penelitian

Biji melinjo berwarna merah penuh, enzim alkalase, reagen Bradford, TNBS (*trinitro-benzene-sulfonic acid*), *Bovine Serum Albumin (BSA)*, *L-leucin*, GSH (*L-Glutathione reduced minimum 99*) Sigma Aldrich, ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*), pirogalol (*1,2,3-benzenetriol*), *Phosphate Buffer Saline (PBS)*, *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-penylalanine (fMLP)*, *Nitroblue Tetra Zolium (NBT)*, *Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)*, darah vena peripheral (*heparinized whole blood*), *LSM (Lymphocyte Separation Medium)* ($d=1,077 \text{ g/mL}$), *ficoll hypaque gradient* ($d=1,119 \text{ g/mL}$), antikoagulan heparin, *Penicilin-Streptomycin*, *Fungizone-Amphotericin*, alkohol, giemsa, safranin, aquadest, aquabidest, NaOH, HCl, Sodium sulfit (Na_2SO_3), *potassium persulfate*, buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2, methanol, buffer Na Fosfat 0,2 M pH 8, aluminium foil, kain kasa steril, kertas hisap, dan bahan pendukung lainnya.

3.8 Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap pertama bertujuan untuk mendapatkan protein biji melinjo terhidrolisis yang telah diuji aktivitas antioksidannya terhadap radikal ABTS dan superoksida pirogalol. Konsentrasi Gg-PH yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi terhadap radikal superoksida pirogalol diaplikasikan sebagai protein antioksidan. Tahap kedua bertujuan untuk

menguji aktivitas protein antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil menggunakan metode *Nitroblue Tetrazolium* (NBT).

3.8.1 Hidrolisis, Uji ABTS, dan Pirogalol Protein Biji Melinjo Terhidrolisis

Hidrolisis protein biji melinjo diawali dengan tahap ekstraksi protein biji melinjo menghasilkan protein kasar biji melinjo (Gg-PK), isolasi Gg-PK menghasilkan protein isolat biji melinjo (Gg-PI), selanjutnya hidrolisis Gg-PI menggunakan alkalase selama 5 jam menghasilkan protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) dan penghitungan derajat hidrolisis Gg-PH. Tiap tahap pemurnian protein diuji total protein terlarut untuk mengetahui konsentrasi protein. Setelah diuji aktivitas antioksidan ABTS dan pirogallol, konsentrasi Gg-PH yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi terhadap radikal superoksida metode Pirogalol dipaparkan pada neutrofil.

a. Ekstraksi Biji Melinjo

Bahan baku yang digunakan adalah 123 gram biji melinjo berwarna merah penuh yang diperoleh dari daerah Jember. Kulit biji melinjo dan lapisan kedua biji dihilangkan secara manual. Selanjutnya, biji melinjo diekstraksi menggunakan aquadest (perbandingan 1:3) selama 30 menit. Biji melinjo yang telah diekstraksi kemudian dihaluskan menggunakan blender, selama proses penghalusan ditambahkan air rendaman ekstraksi sedikit demi sedikit hingga mendapatkan konsistensi yang halus dan homogen. Selanjutnya, dilakukan penyaringan menggunakan kasa steril. Larutan hasil saringan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar biji melinjo (Gg-PK).

b. Isolasi Protein Biji Melinjo

Pengisolasian protein biji melinjo menggunakan metode *isoelectric precipitation*. Protein kasar biji melinjo (Gg-PK) diatur pHnya menjadi 8 dengan menambahkan 1 N NaOH. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm, pada suhu 15⁰C selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diatur pHnya menjadi 4 dengan menambahkan 1 M HCl. Pada pH ini sebagian besar protein akan mengendap di titik isoelektriknya. Suspensi didiamkan selama 30 menit agar protein dapat terendapkan secara sempurna. Kemudian, larutan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm dengan suhu 15⁰C selama 10 menit untuk memisahkan protein berupa endapan dan cairan sisa yang mengandung bahan-bahan terlarut seperti gula, mineral, dan sebagainya. Endapan protein kemudian dilarutkan dalam aquadest dan diatur pHnya menjadi 8 dengan menggunakan 1 N NaOH. Hasil dari isolasi protein ini disebut sebagai protein isolat biji melinjo (Gg-PI).

c. Ekstraksi Protein Terhidrolisis Biji Melinjo

Pengkondisian protein terhidrolisis biji melinjo dilakukan setelah melalui proses ekstraksi dan pengujian kadar protein Bradford. Hidrolisis protein dilakukan dengan menghidrolisis protein isolat biji melinjo (Gg-PI) menggunakan enzim alkalase dengan 10 kali pengenceran selama 5 jam pada suhu 50⁰C. Terminasi enzim dilakukan dengan pemanasan pada suhu 95⁰C selama 10 menit. Selanjutnya hasilnya disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm pada suhu 27⁰C selama 1 menit. Bagian supernatan kemudian akan dianalisis sebagai protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH).

d. Penentuan Total Protein Terlarut

Kandungan protein dari setiap tahap pemurnian protein diukur dengan menggunakan metode Bradford (1976). Prinsip kerja metode ini didasarkan pada

pengikatan secara langsung zat warna *Coomasie Brilliant Blue* G250 (CBBG) oleh protein. Reagen CBBG bebas berwarna merah kecoklatan, sedangkan dalam suasana basa reagen CBBG akan berbentuk anion yang mengikat protein membentuk warna biru. Metode Bradford menggunakan protein biji melinjo 5 µl, ditambahkan dengan 45 µl aquadest, dan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 595 nm. Hasil yang didapat dibandingkan dengan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) untuk mengetahui kandungan protein terlarut (Nielsen, 2003).

e. Pengukuran Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis diukur menggunakan metode *trinitro-benzene-sulfonic-acid* (TNBS). Metode TNBS ini didasarkan pada reaksi primer asam amino dengan reagen TNBS membentuk kromofor yang absorbansinya diamati menggunakan spektrofotometer (Adler-Nissen, 2002; Nielsen, 2010). Uji TNBS menggunakan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) 10 µl, dicampur dengan 415 µl buffer Na fosfat 0,2 M pH 8, dan 200 µl 0,1 % TNBS. Setelah dihomogenkan dengan vortex, larutan kemudian diinkubasi gelap pada suhu 50°C selama 30 menit. Selanjutnya, tambahkan larutan sodium sulfite (Na_2SO_3) 0,1 M sebanyak 400 µl dan ditunggu selama 15 menit. Pengukuran derajat absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang λ 420 nm. Larutan 1,5 mM L-Leucine digunakan sebagai standar. Persentase derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan $\text{DH} = h/h_{\text{tot}} \times 100\%$, dimana h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein

f. Uji Peredaman Radikal ABTS

Uji peredaman radikal bebas ABTS menggunakan senyawa *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)* sebagai sumber penghasil radikal bebas.

Reagen ABTS berwarna kehijauan, peredaman protein biji melinjo terhadap radikal ABTS ditunjukkan dengan perubahan warna larutan yang menjadi lebih bening. Uji peredaman radikal ABTS sesuai metode yang dideskripsikan You *et al* (2002). Reagen ABTS dipersiapkan dengan mencampurkan 7 mM ABTS dan 2,45 mM *potassium persulfate* dengan jumlah sebanding, kemudian diinkubasi gelap selama 12-16 jam pada suhu ruang. Sebelum memulai pengujian reagen ABTS dilarutkan dengan 0,2 M *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,4 hingga besar absorbansi $0,70 \pm 0,02$ pada panjang gelombang λ 734 nm. Larutan blank sebagai kontrol dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan protein. Campuran sampel dan reagen ABTS divortex sampai homogen selama 30 detik. Uji peredaman radikal ABTS dinyatakan sebagai persen (%) peredaman terhadap radikal ABTS. Persen peredaman dihitung sesuai rumus:

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

Dimana A_{kontrol} merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan protein (standar) dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan protein.

g. Uji Peredaman Radikal Superoksida dengan Metode Piragalol

Aktivitas peredaman radikal radikal superoksida menggunakan metode pirogalol (1,2,3-*benzenetriol*). Reagen pirogalol yang digunakan dalam metode ini merupakan senyawa tidak berwarna, pada suasana basa senyawa ini mengalami autooksidasi yang menghasilkan radikal superoksida dan orthoquinon (II). Orthoquinon yang telah terbentuk akan dioksidasi oleh radikal superoksida dan menghasilkan purpulloalin (2,3,4,6-*tetrahydroxy-5H-benzocycloheptene-5-one*, III) berwarna orange yang dibaca dengan spektrofotometer λ 320 nm (Gao, 1998). Metode pirogalol yang digunakan dalam penelitian seperti dideskripsikan oleh Siswoyo *et al* (2012). Protein biji melinjo 0,1 mL dicampur dengan 1,8 mL

buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2. Campuran diinkubasi selama 10 menit, kemudian ditambahkan 0,1 mL 10 mM pirogalol dalam 10 mM HCl. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 320 nm selama 4 menit. Laju oksidasi pirogalol dihitung dari kemiringan garis absorbansi atau *slope*. Persentase dihitung sesuai rumus:

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

Dimana A_{kontrol} merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (standar) dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel.

3.8.2 Uji Aktivitas Antioksidan Gg-PH terhadap Radikal Superoksida (O_2^-) Neutrofil

Uji aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil menggunakan metode *Nitroblue Tetrazolium* (NBT), yaitu dengan menghitung sel berwarna biru keunguan karena mengandung deposit formasan *blue* hasil reduksi *membrane permeable, water soluble, yellow-colored, nitroblue tetrazolium* (Y-NBT) oleh radikal superoksida (O_2^-). Stimulan yang digunakan berupa *N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine* (fMLP). Deteksi aktivitas antioksidan Gg-PH terhadap radikal superoksida neutrofil dilakukan melalui dua pengamatan, yaitu pengamatan mikroskopik pada pelet sel untuk mengamati produksi radikal superoksida intra seluler dan spektrofotometer pada medium untuk mengamati produksi radikal superoksida ekstra seluler (Choi, 2006).

a. Prosedur Isolasi Neutrofil

1. Siapkan 12 mL darah vena peripheral orang sehat, lalu dimasukkan ke dalam tiga tabung heparin masing-masing 4 mL
2. Tabung heparin digoyangkan selama beberapa detik agar darah bercampur dengan antikoagulan (*heparinized whole blood*)
3. Sentrifugasi 600 rpm selama 10 menit untuk memisahkan plasma dari sel darah dan mengurangi kontaminasi platelet
4. Plasma darah dibuang, sedangkan *buffy coat* yang mengandung sel darah diaspirasi
5. Selanjutnya, lapiskan 3 mL *ficoll hypaque 1119* secara hati-hati pada tabung falcon dengan teknik ujung mikro pipet ditempelkan pada dinding tabung, dan disemprotkan secara perlahan-lahan untuk mencegah pecahnya ficoll.
6. Lapiskan 3 mL *Lymphocyte Separation Medium (LSM)* diatas *ficoll hypaque 1119*
7. Setelah itu, dilakukan pelapisan 6 mL darah diatas *gradient* tabung tadi
8. Sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 30 menit pada suhu ruang
9. Lakukan pengamatan pada dua lapisan *buffy coat* yang terbentuk. Neutrofil berada diantara lapisan LSM dan *ficoll hypaque 1119*, sedangkan monosit berada pada lapisan atas diantara plasma dan LSM.
10. Plasma yang terbentuk diatas mononuklear diaspirasi dan dibuang, lalu *buffy coat* monosit diaspirasi dan dimasukkan ke dalam tabung falcon lain untuk penelitian lainnya. LSM yang berada diatas *buffy coat* neutrofil diaspirasi dan dibuang.

11. *Buffy coat* yang mengandung neutrofil diaspirasi menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam falcon
 12. *Buffy coat* neutrofil kemudian dicuci 2x menggunakan HBSS 1000 μ l dan disentrifugasi 1700 rpm, 10 menit pada suhu ruangan
 13. Supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet neutrofil diresuspensi menggunakan HBSS sebanyak 2 mL
 14. 100 μ l neutrofil ditempelkan pada *cover glass* lalu diamati dibawah mikroskop untuk melihat populasi sel neutrofil, lalu di fiksasi methanol dan di cat giemsa
- b. Pemaparan Neutrofil dengan Protein Terhidrolisis Biji Melinjo (Gg-PH) dan fMLP
1. Siapkan 18 *cover glass* yang telah didesinfektan menggunakan *autoclave*
 2. *Cover glass* diletakkan pada masing-masing *chamber* dalam 2 *wells* (12 *chambers*)
 3. Neutrofil dibagi menjadi beberapa kelompok dimana masing-masing kelompok terdiri dari 2 *chambers*, sebagai berikut:
 - a. *Well 1* terdiri dari kelompok inkubasi *only* 1 jam, FMLP 1 jam, GSH 1 jam, Gg-PH 1 jam, dan kelompok pra inkubasi
 - b. *Well 2* terdiri dari kelompok inkubasi *only* 18 jam, FMLP 18 jam, GSH 18 jam, dan Gg-PH 18 jam
 4. 1800 μ l neutrofil dilapiskan pada *cover glass* (@100 μ l) dan diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator dengan suhu 37⁰C untuk penempelan sel
 5. Siapkan *Penicilin–Streptomycin* 240 μ l dan *Fungizone- Amphotericin* 60 μ l lalu ditambahkan dengan HBSS sampai volume 12 mL
 6. Larutan HBSS yang telah dicampur antibiotik dan antijamur kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing *chamber* dalam *well* (@600 μ l)

7. Inkubasi 30 menit dalam inkubator suhu 37°C untuk menempelkan sel
8. Setelah inkubasi, larutan HBSS dibuang dan dilakukan pencucian dua kali lagi dengan menggunakan HBSS 1000 μl
9. Neutrofil diresuspensi dengan HBSS pada masing-masing *chamber*. Kelompok FMLP diresuspensi dengan 650 μl HBSS, kelompok GSH 550 μl HBSS, kelompok Gg-PH 550 μl HBSS, kelompok inkubasi *only* 750 μl HBSS, dan kelompok pra inkubasi 750 μl HBSS
10. Inkubasi 15 menit dalam inkubator suhu 37°C untuk *resting* sel
11. Setelah *resting* sel, kelompok pra inkubasi diberi NBT 250 μl lalu mediumnya di koleksi dalam tabung *ependorf* untuk dilakukan pemeriksaan spektrofotometer, sedangkan pelet sel kelompok pra inkubasi di fiksasi methanol dan di cat safranin (*counter strain*) untuk pemeriksaan mikroskopik
12. Setelah *resting* sel, neutrofil kelompok GSH dipapar 100 μl protein-X yang mengandung *L-Glutathione reduced minimum* 99 konsentrasi 10 μg yang telah disterilasi menggunakan filter 0,2 μm , sedangkan neutrofil kelompok Gg-PH dipapar 100 μl Gg-PH konsentrasi 30 μg yang juga telah disterilasi menggunakan filter 0,2 μm
13. Inkubasi selama 30 menit dalam inkubator *shaker* dengan suhu 37°C
14. Setelah itu, dilakukan pemaparan 100 μl (10^{-7} M) antigen fMLP pada kelompok FMLP, GSH, dan Gg-PH
15. Pemaparan 250 μl NBT pada semua kelompok
16. Inkubasi selama 1 jam pada kelompok inkubasi 1 jam dan 18 jam pada kelompok inkubasi 18 jam, dalam inkubator *shaker* suhu 37°C (Choi, 2006; Yagisawa, 1996).

c. Deteksi Aktivitas Gg-PH terhadap Radikal Superoksida Neutrofil

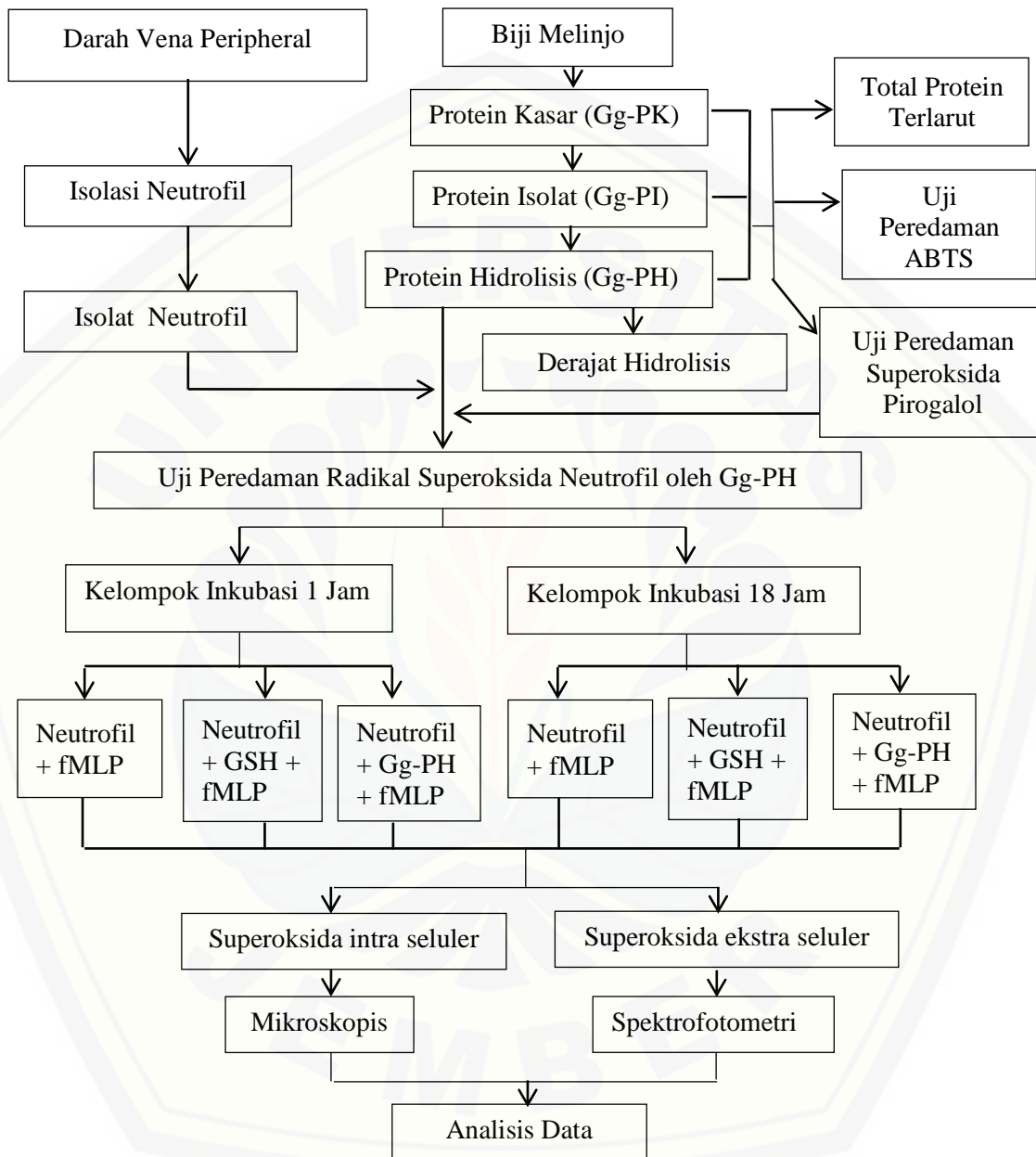
1. Uji Spektrofotometri

Pemeriksaan spektrofotometer menggunakan *microplate reader* untuk deteksi radikal superoksida ekstra seluler. Medium di *chamber (well 12)* pada semua kelompok dipindahkan ke *well plate 96 (@200 μ l)* untuk dilakukan pengukuran absorbansi dengan panjang gelombang λ 630 nm. HBSS digunakan sebagai larutan standar.

2. Uji Mikroskopis

Pemeriksaan secara mikroskopis digunakan untuk membuktikan bahwa telah dihasilkan radikal bebas superoksida intra seluler, melalui penghitungan jumlah sel neutrofil yang berwarna biru keunguan karena mengandung deposit formazan *blue*. Setelah medium di ambil, neutrofil yang menempel pada *cover glass* dicuci dua kali menggunakan HBSS, diangin-anginkan lalu di fiksasi dengan metanol. Pewarnaan menggunakan larutan safranin (*counter strain*). Persentase sel yang mengandung partikel formazan *blue* (sel NBT-positif) ditentukan dengan menghitung 100 sel neutrofil secara acak tiap kelompok membentuk huruf U pada preparat oleh 3 pengamat dengan bantuan *Opti Lab* mikroskop perbesaran 1000x (Choi, 2006).

3.9 Bagan Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan alur penelitian

Keterangan:

- Neutrofil + fMLP : neutrofil diinduksi antigen 10^{-7} M fMLP
- Neutrofil + GSH + fMLP : neutrofil dipapar antigen fMLP 10^{-7} M dan $10 \mu\text{g}$ GSH
- Neutrofil + Gg-PH + fMLP : neutrofil dipapar antigen fMLP 10^{-7} M dan $30 \mu\text{g}$ Gg-PH

3.10 Analisis Data

Dalam penelitian ini data yang didapatkan yaitu nilai rata-rata absorbansi produksi radikal superoksida ekstra seluler dan rata-rata jumlah sel neutrofil yang memproduksi radikal superoksida intra seluler dianalisis menggunakan uji statistik *Two Way Anova* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Hasil uji *Two Way Anova* produksi radikal superoksida ekstra seluler tidak terdapat perbedaan bermakna ($p>0,05$) antara interaksi jenis perlakuan dan waktu inkubasi sehingga tidak dilakukan uji lanjut. Hasil uji *Two Way Anova* produksi radikal superoksida intra seluler terdapat perbedaan bermakna ($p<0,05$) antara interaksi jenis perlakuan dan waktu inkubasi sehingga dilanjutkan dengan uji *Post Hoc LSD* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasar hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan:

- a. Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) mampu meredam produksi radikal superoksida neutrofil
- b. Terdapat perbedaan yang bermakna antara aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) yang diinkubasi 1 jam dan 18 jam. Gg-PH mampu meredam produksi radikal superoksida neutrofil pada inkubasi selama 1 jam, sedangkan pada inkubasi selama 18 jam terjadi stres oksidatif sel karena konsentrasi Gg-PH yang digunakan tidak dapat meredam radikal superoksida yang terus diproduksi selama 18 jam

5.2 SARAN

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang konsentrasi, durasi, dan jenis protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) yang efektif meredam produksi radikal superoksida neutrofil
- b. Perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut uji radikal superoksida ekstra seluler
- c. Perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji toksisitas dan uji *in vivo* protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH)

DAFTAR PUSTAKA

- Adler-Nissen, Jens. 2002. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 1256-1262.
- Amirudin, R., Nella, S. 2004. *Peran Radikal Bebas pada Penyakit Hati Kronis, Diagnostocum*. Bandung: Prodia Diagnosticum Educational Service.
- Andersen, Burton R & English, Denis. 1974. Single-step Separation of Red Blood Cells, Granulocytes and Mononuclear Leukocytes on Discontinuous Density Gradient of Ficoll-Hypaque. *J. Immunol Methods*. Vol. 5: 249-255.
- Araujo, V., Arnal, C., and Boronat, M. 1998. Oxidant-anti Oxidant Imbalance In Blood of Children with Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Bio Factor*. Vol. 8: 155-59.
- Arnao, MB. 2000. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity using Chromogen Radical: a Practical Case. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 419-421.
- Baratawidjaja KG. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi 6. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET & Runge MS. 2001. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest*. 108:1513–1522.
- 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.
- Cadiz, Rafael T & Florido, Helen B. 2001. *Bago: Gnetum gnemon Linn*. Research Information Series on Ecosystem. Vol 13 (2).

- Campbell, Neil A., Reece, Jane B & Mitchell, Lawrence G. 2002. *Biology*. Ed.5. Jakarta: Erlangga.
- Chapple, Iain L.C & Matthews, John B. 2007. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *J. Compilation. Periodontology*, Vol. 43, 160-232.
- Choi, Hyung Sim., Kim, Jun Wo., Cha, Young-Nam & Kim, Chaekyun. 2006. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*. 27: 31-44.
- Clark, Robert A. 1999. Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *Journal of Infectious diseases*.
- Clarkson, P. M. & Thompson, H. S. 2000. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 72: 637S-46S.
- Dahlgren, Claes & Karlsson, Anna. 1999. *Respiratory burst in human neutrophils. Journal of Immunologic Methods*.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D & Milzani, A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human diseases. *Clin. Chem*. Vol. 52: 601-623.
- Dalpiaz, A., Spisani, S., Biondi, C., Fabbri, E., Nalli, M & Ferretti, M. E. 2003. Studies on Human Neutrophil Biological Functions by Means of Formyl-peptide Receptor Agonist and Antagonists. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*. Vol. 3: 33-42.
- Diaz, M & Decker, E.A. 2005. Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrolysates and their application in ground beef. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 52: 8208-8213.
- Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI. 1996. *Kandungan Gizi Melinjo*. Jakarta: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI.
- Dorland. 2006. *Kamus Kedokteran Dorland*. Edisi 29. Jakarta: EGC.
- Droge, W. 2002. *Free Radical In The Physiological Control of Cell Function, PhysiolRev*. Vol. 82:47-95.

- Elias, R.J., Bridgewater, J.D., Vachet, R.W., Waraho, T., McClements, D.J., and Decker, E. A. 2006. Antioxidant mechanism of enzymatic hydrolysates of β -lactoglobulin in food lipid dispersions. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54: 9565-9572.
- Elias, Ryan J., Kellerby, Sarah S & Decker, Eric A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* Vol. 48: 430-441. ISSN: 10.1080/10408390701425615.
- Forman, Henry J & Torres, Martin. 2002. Reactive Oxygen Species and Cell Signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* Vol 166: S4-S8. Los Angeles, California.
- Gao, Ruomei., Yuan, Zhuobin., Zhao, Zhiqiang and Gao, Xiurui. 1998. Mechanism of pyrogallol autooxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. *J Bioelectrochemistry and Bioenergetics* Vol.45: 41-45.
- Gaut, J.P., *et al.* 2001. *Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis.* In: National Academy of Sciences.
- Gough, P.J., Gomez, I.G., Wille P.T & Raines, E.W. 2006. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 116: 59-69.
- Guyton, A. C., dan Hall, J. E. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran, Edisi 11.* Terjemahan Irawati dkk. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Halliwell, B. & Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 142, 231-55.
- Hanan, Abdul & Sutrisno. 2000. *Gnemon: Tumbuhan Lahan Kering Multi Guna dan Konservasinya di Kebun Raya Bogor.* Seminar Nasional Konservasi dan Pendayagunaan Keanekaragaman Tunbuan Lahan Kering. Bogor: Kebun Raya Bogor-LIPI.
- Hariana, Arief, 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Seri 2.* Depok: Penebar Swadaya.

- Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B & Amigo, L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 588-593.
- Hidayat, A.A.A. 2010. *Metode Penelitian Kesehatan; Paradigma Kuantitatif*. Surabaya: Health Books Publishing.
- Hisada, H., Asahara, M., Kato, E & Sakan F. 2005. *Antibacterial and Antioxidative Constituent of Melinjo Seeds and their Application to Foods*. Japan. Science Links Japan.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Kato, Eishin, Hosoda, and Fukushi. 2007. *Gnetum Extract*. European Patent Application.
- Kato, E., Tokunaga, Y & Sakan, F. 2009. Stilbenoids isolated from the seeds of melinjo (*Gnetum gnemon L.*) and their biological activity. Japan. *J. Agric Food Chem.* Vol. 57 (6): 2544-2549.
- Kirkwood, Nisengard, Haake and Miyasaki. 2006. *Carranza's Clinical Periodontology 10th ed.* London: WB. Saunders.
- Kong, B & Xiong, X. L. 2006. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 54: 6059-6068.
- Levine, R. L & Stadtman, E. R. 2001. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* Vol. 36: 1495-1502.
- Lim, T.K. 2012. *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants: Volume 3, Fruits*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Manner, H.I. & Elevitch, C.R. 2006. *Gnetum gnemon (gnemon)*. Ver 1.1 In: Elevitch, C.R. (ed). *Species Profiles for Pasific Inland Agroforestry*. Hawaii: Permanent Agriculture Resources (PAR): 1-9.
- Marks, Dawn., Marks, Allan & Smith, Colleen. 2000. *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah

- Pendekatan Klinis. Suyono, Joko et al. Jakarta: EGC. ISBN: 979-448-483-0.
- McIntyre, M., Bohr, David F & Dominiczak, Anna F. 1999. Endothelial Function in Hypertension. The Role of Superoxide Anion. *Hypertension*. 34(4): 539-545.
- Mori, M. 2008. *Relationship between Lifestyle-related Diseases with the Intake of Indonesian Traditional Fruit Melinjo Rich in Phytoestrogens*. The 4th International Niigata Symposium on Diet and Health Integrative Functoon of diet in Antiaging and Cancer Prevention. Niigata, Japan.
- Mulyanto, Joko. 1995. *Budidaya Melinjo*. Yogyakarta: Kanisius.
- Nelson, David L & Cox, Michael M. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry Fourth Edition*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Nielsen, S. 2001. "Introduction of Food Analysis" dalam S. Nielsen (Ed). 2010. *Food Analysis*. New York: Springer Science.
- Nielsen, Suzanne. 2003. *Food Analysis 3rd edition*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Notoatmodjo, Soekidjo. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Edisi Revisi. Jakarta: Bhineka Chipta.
- Ortiz, Sara E Molina and Wagner, Jorge R. 2001. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *J. Food Research International*. Vol. 35: 511-518.
- Orwa C., A Mutua., Kindt R., Jamnadass R & S Anthony. 2009. *Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0*.
- Ostidal, H., Davies, M.J & Andersen, H.J. 2002. Reaction between protein radicals and other biomolecules. *Free Rad Biol Med*. 33: 201-209.
- Paclet, Marie H., Clare D, Peter K, Jasminka GZ, Anthony WS & Lodewijck V. Dekker. 2004. N-Formyl peptide receptor subtypes in human neutrophils activate L-plastin phosphorylation through different signal transduction intermediates. *Journal Biochem*. 377: 469-477.

- Parhusip, A.D.J & Azis Boing S. 2011. Antimicrobial Activity of Melinjo Seed and Peel Extract (*Gnetum gnemon*) Against Selected Pathogenic Bacteria. *Jurnalchem*. Vol 5 (3): 103-112.
- Park, E.Y., Murakami, H., Mori, T & Matsumura, Y. 2005. Effect of protein and peptide addition on lipid oxidation in powder model system. *J. Agric. Food Chem*. 53: 137-144.
- Rival, S. G., Fornaroli, S., Boeriu, C. G & Wichers, H.J. 2001. Caseins and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 49: 287-294.
- Sakanaka, S & Tachibana, Y. 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chem*. 95: 243-249.
- Sanmugapriya, E & S. Venkataraman. 2006. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorium* Linn. Seeds on CCL₄ induced acute hepatic injury in experimental rats. *J. Ethnopharmacol*. Vol 105(1-2): 154-160.
- Santoso, Martha., Yuko Nata, Clement Angkawidjaja, Tomoko Yamaguchi, Teruyoshi Matoba & Hithosi Takamura. 2010. Antioxidant and DNA Damage Prevention Activities of The Edible Parts of *Gnetum gnemon* and Their Changes upon Heat Treatment. *Food Sci. Technol. Res*. 16 (6): 549-556.
- Shimada, K., Fujikawa K., Yahara K & Nakamura T. 1992. Antioxidative Properties of Xanthone on the Auto Oxidation of Soybean in Clycodextrin Emulsion. *J. Agr Food Chem*. 40: 945-948.
- Simanjuntak, K. 2007. *Radikal Bebas Dari Senyawa Toksik Karbon Tetraklorida (CCL₄)*. Bina Widya. Vol. 18 (1): 25-31.
- Siswoyo, T.A., Aldino, Madios., Ningsih, Wahdyah., Purnama Okviandari. 2007. *Isolasi Protein Antioksidan Dari Biji Melinjo (Gnetum gnemon L)*. Jember: Pusat Penelitian Biologi Molekul dan Jurusan Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Siswoyo, T.A., Mardiana, E., Lee, K.O., dan Hoshokawa, K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum*

- gnemon Linn) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 59: 5648-5656.
- Siswoyo, T.A., dan Hoshokawa, K. 2012. Produksi Pengembangan Protein Antihipertensi Generasi Baru dari Gnetum gnemon Protein sebagai Bahan Nutraceutical Komersial. *Prosiding InSINas*. Vol. 0652: 217-222.
- Soares, Raquel & Costa, Carla. 2009. *Oxidative Stress, Inflammation, and Angiogenesis in The Metabolic Syndrome*. Springer Science & Business Media. ISBN: 9781402097010.
- Sudiana, I Ketut. 2008. *Patobiologi Molekuler*. Jakarta: Salemba Medika.
- Suryohudoyo, P. 2010. *Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas*. Surabaya: Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair.
- Susilawati, I.D.A., 2008. "Induksi *Porphyromonas gingivalis* terhadap Aktivitas Kolagenolisis Netrofil pada Kolagen Tipe IV (Studi in vitro Mekanisme Kolagenolisis Plak aterosklerotik)." Tidak Diterbitkan. Disertasi. Malang: Program Pascasarjana Universitas Brawijaya.
- Tampubolon, Wanti. 2013. *Informasi Singkat Benih*. Direktorat Perbenihan Tanaman Hutan. Makassar: BPTH.
- Tjitrosoepomo, Gembong. 2004. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Valko M, *et al*. 2006. Free radical, metal, and antioxidant in oxidative stress induced cancer. *J. Chem. Biol. Interact*. Vol. 160: 1-40.
- Varh liou G, Storz P. 2010. Reactive Oxygen Species in Cancer. *Free Radical Research*. 44(5): 479-496.
- Wang, L. L & Xiong, X. L. 2005. Inhibition of lipid oxidation in cook beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability. *J. Agric. Food Chem*. Vol. 53: 9186-9192.
- Wang, Wen-Bin, Yun-Hee Kim, Haeng-Son Lee, Ki-Young 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*. Vol. 47: 550-557.

- Widayati, Eni. 2012. *Oxidasi Biologi, Radikal Bebas, dan Antioxidant*. Bagian Kimia-Biokimia FK Unissula Semarang.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kaninus.
- Witt, Dariusz. 2008. Recent Development in Disulfide Bond Formation. Department of Organic Chemistry, Chemical Faculty, Gdansk university of Technology, Narutowicza, Gdansk, Poland. *Synthesis*. New York: Thieme Stuttgart. 16: 2491-2509.
- Yagisawa, M *et al.* 1996. Superoxide Release and NADPH Oxidase Components in Mature Human Phagocytes: Correlation between Functional Capacity and Amount of Functional Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 228: 510-516.
- You, Rem., Argly M., Sunxiang, C & Roome. 2002. Protective Effect of Metallothionein-III on DNA Damage in Response to Reactive Oxygen Species. *Biochim. Biophys. Acta* 1573: 33-36.

LAMPIRAN

Lampiran A. Penghitungan Jumlah Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus dari

Daniel (2005), yaitu :

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n : Besar sampel tiap kelompok

σ : Standart deviasi sampel

d : Kesalahan yang masih dapat ditolerir, diasumsikan $\sigma = d$

z : Nilai pada tingkat kesalahan tertentu, jika $\alpha = 0,05$ maka $z = 1,96$

Penghitungannya adalah sebagai berikut:

$$n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n = \frac{1,96^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$n = 1,96^2$$

$$n = 3,84$$

Jadi besar sampel minimal berdasarkan perhitungan diatas adalah empat sampel untuk tiap kelompok.

Lampiran B. *Ethical Approva*

KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877
Jember 68121 Email : lk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVA

Nomor : 759/H25.1.11/KE/2015

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PROTEIN BLJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*) TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA NEUTROFIL IN VITRO

Nama Peneliti Utama : A.A Istri Puspita S.D. (Nim :121610101087)
Name of the principal investigator


Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 8/2 2016 2015

dr. Rini Riyanti, Sp.PK

Lampiran C. Surat Ijin Penelitian


 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
 UNIVERSITAS JEMBER
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 533536, Faks. 331991


Nomor : 454/UN25.8/TL/2015
 Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
 Kepala Center For Development Of Advanced Sciences
 And Technology (CDAST) Universitas Jember
 di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan Skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan Ijin Penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

1. Nama	: A.A Istri Puspita Sari Dewi
2. NIM	: 121610101087
3. Tahun Akademik	: 2015/2016
4. Fakultas	: Kedokteran Gigi Universitas Jember
5. Alamat	: Perum Cluster Tidar Asri A9-10 Jember
6. Judul Penelitian	: Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (Gnetum Gnemon Linn) Terhidrolisis Terhadap Radical Superoksida Neutrofil In Vitro.
7. Lokasi Penelitian	: Center For Development Of Advanced Sciences And Technology Universitas Jember
8. Data/Alat yg dipinjam	: Centrifuse, spektrofotometer, incubator, dll
9. Waktu	: Desember 2015 s/d selesai
10. Tujuan Penelitian	: Untuk Mengetahui Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (Gnetum Gnemon Linn) Terhidrolisis Terhadap Radical Superoksida Neutrofil In Vitro.
11. Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes 2. Prof. drg. Tri Agus Siswoyo, M.Agr, Ph.D

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 02 DEC 2015
 Ins. Dekan
 Pembantu Dekan I

Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
 NIP. 1969011219996011001



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 3312/UN25.8/TL/2015
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth.
Direktur RSGM Universitas Jember
di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa di bawah ini :

- | | |
|--------------------------|---|
| 1. Nama | : A.A Istri Puspita Sari Dewi |
| 2. NIM | : 121610101087 |
| 3. Tahun Akademik | : 2015/2016 |
| 4. Fakultas | : Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5. Alamat | : Tidar Cluster A 9-10 Jember |
| 6. Judul Penelitian | : Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (Gnetum Gnemon Linn) Terhidrolisis Sebagai Antioksidan Terhadap Superoksidas Neutrofil In Vitro |
| 7. Lokasi Penelitian | : Lab. Bioscience RSGM Universitas Jember |
| 8. Data/Alat yg dipinjam | : Centrifuse, incubator shaker, mikroskop binokuler, laminar flow |
| 9. Waktu | : September 2015 s/d Selesai |
| 10. Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (Gnetum Gnemon Linn) Terhidrolisis Sebagai Antioksidan Terhadap Superoksidas Neutrofil In Vitro |
| 11. Dosen Pembimbing | : 1. Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP, M.Agr, Ph.D |

Demikian atas perkenan dan kerjasama yang baik disampaikan terima kasih.

Jember, 10 SEP 2015

an Dekan
Pembantu Dekan I



Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes
NIP. 196109031986022001

Lampiran D. Surat Persetujuan Subjek Penelitian**SURAT PERSETUJUAN**
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Malun Nasrudin
umur : 21 tahun
jenis kelamin : Laki-laki

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari:

nama : A.A. Istri Puspita Sari Dewi
NIM : 121610101087
fakultas : Kedokteran Gigi
alamat : Perum Cluster Tidar Asri A9-10, Jl. Tidar, Jember

dengan judul penelitian "Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon Linn*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro", dimana prosedur pelaksanaan penelitian untuk pengambilan sampel ini tidak akan menimbulkan resiko bagi subyek yang bersangkutan.

Saya telah membaca atau dibacakan prosedur penelitian yang terlampir dan telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan diberi jawaban dengan jelas.

Surat persetujuan ini saya tulis dengan sebenar-benarnya tanpa suatu paksaan dari pihak manapun. Dengan ini saya menyatakan dengan sukarela sanggup menjadi subyek dalam penelitian ini.

Jember, 6 Januari, 2016

Yang menyatakan


Malun Nasrudin

PERSETUJUAN KEIKUTSERTAAN DALAM PENELITIAN

Semua penjelasan tersebut telah disampaikan kepada saya dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh peneliti/dokter. Saya mengerti bahwa bila memerlukan penjelasan, saya dapat menanyakan kepada A.A. Istri Puspita Sari Dewi atau Dr. drg. I D A Susilawati, M.Kes. Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut serta dalam penelitian ini

Jember, 6 Januari 2016

Responden



(Malon Nasrudin)

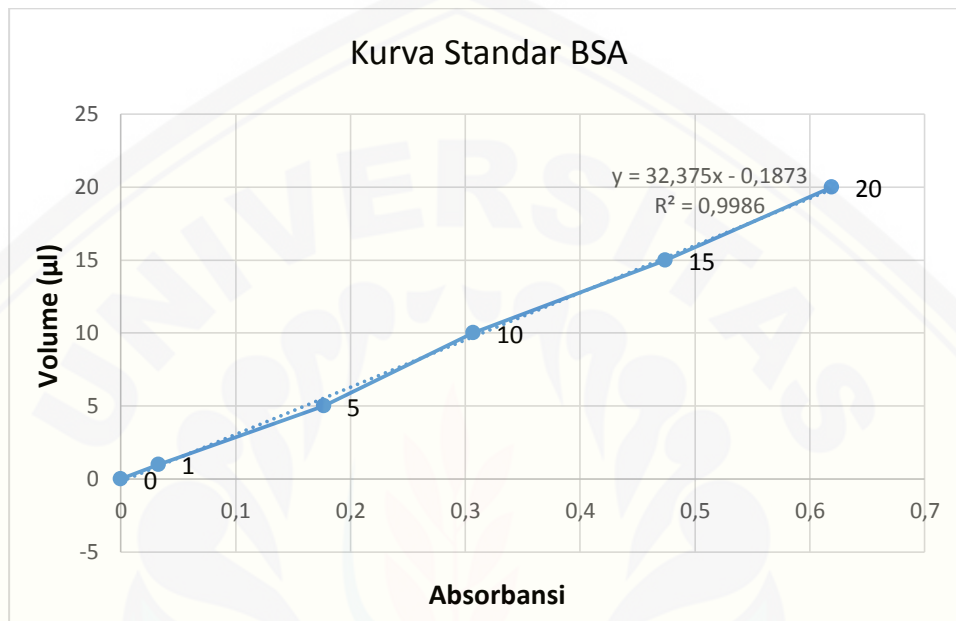
Saksi



(Izza Khalida)

Lampiran E. Penghitungan Total Protein Terlarut Biji Melinjo (Uji Bradford)

E.1 Standar BSA untuk Penentuan Proten Terlarut

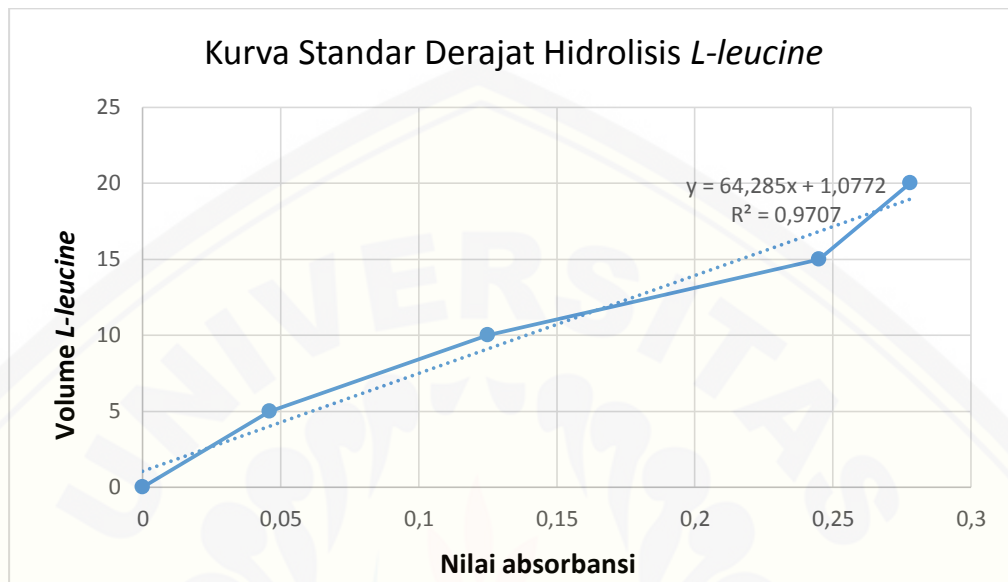


E.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut

Sampel Protein	Rerata Absorbansi	Konsentrasi (µg/µl)	Volume (ul)	Jumlah Protein (mg)
Protein Kasar (Gg-PK)	0,801	5,148	320.000	1647,45
Protein Isolat (Gg-PI)	0,920	5,919	60.000	355,12
Protein Hidrolisat (Gg-PH)	0,498	3,187	8.750	27,88

Lampiran F. Penghitungan Derajat Hidrolisis (DH)

F.1 Standar *L-leucine* untuk Derajat Hidrolisis



F. 2 Penghitungan Derajat Hidrolisis

Protein	Absorbansi			Asam Amino (μ l)				Deviasi	DH
	1	2	3	1	2	3	Rerata		
Hidrolisis 5 jam	0,987	0,911	1,166	21,507	19,879	25,342	22,243	2,81	38%
Hidrolisis total	0,891	0,882	0,901	58,350	57,772	58,993	58,372	0,61	100%

Lampiran G. Uji Radikal ABTS dan Superoksida Pirogalol

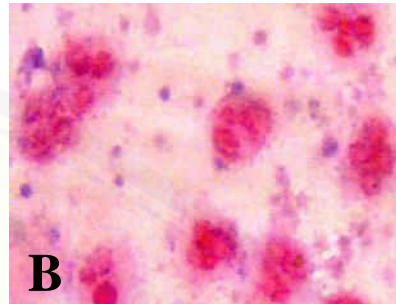
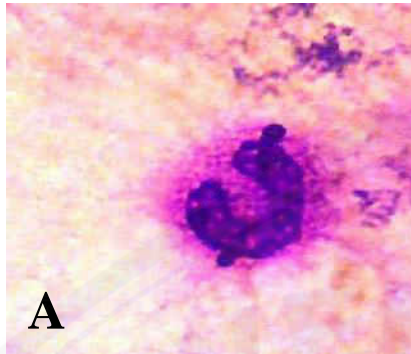
G.1 Uji Radikal ABTS

Sampel Protein	Konsentrasi uji (μg)	Persen inhibisi (%)			Rerata	SD
		1	2	3		
Blank	0	0%	0%	0%	0%	0,00
Gg-PK	6	36,89%	44,89%	40,05%	41%	0,04
Gg-PI	6	51,59%	74,31%	70,97%	66%	0,12
Gg-PH	6	78,96%	82,04%	79,84%	80%	0,02
GSH	6	78,96%	82,29%	80,11%	81%	0,02

G.2 Uji Radikal Superoksida Pirogalol

Sampel Protein	Konsentrasi uji (μg)	Persen Inhibisi (%)
Blank	20	0,00%
Gg-PK	20	16,11%
Gg-PI	20	18,86%
Gg-PH	20	29,02%
	30	30,38%
	40	29,50%
	50	27,13%
	60	28,13%
	100	23,56%
GSH	10	33,00%
	20	34,00%

Lampiran H. Isolasi Neutrofil



Catatan:

A: neutrofil batang (stab) pewarnaan giemsa pembesaran 1000x

B: neutrofil segmen pewarnaan safranin pembesaran 1000x.

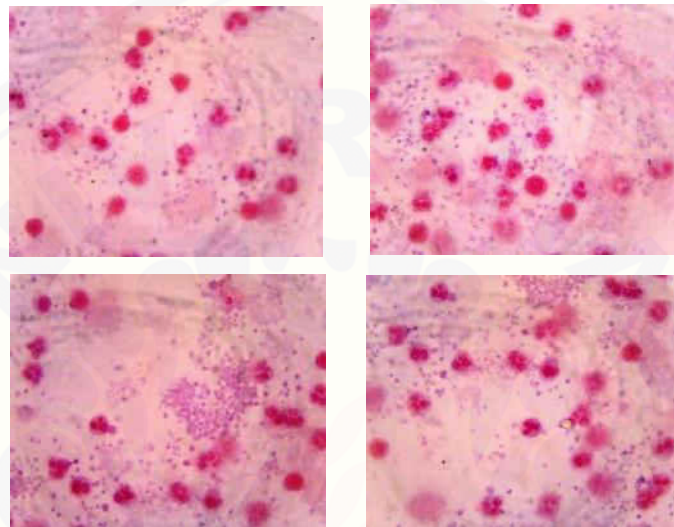
Kelompok	Jumlah Neutrofil yang Memproduksi Radikal Superoksida Intra Seluler				
	Pengamat			Rerata	Rerata/%
	1	2	3		
Inkubasi <i>Only</i> 18 Jam					
1	95	98	87	93,33	
2	96	98	95	96,33	
3	92	96	90	92,67	
4	96	96	92	94,67	
					94,25 94%
FMLP 18 Jam					
1	100	99	99	99,33	
2	97	100	99	98,67	
3	100	100	100	100,00	
4	100	100	100	100,00	
					99,50 99,5%
GSH 18 Jam					
1	96	95	96	95,67	
2	99	98	99	98,67	
3	96	96	93	95,00	
4	96	96	95	95,67	
					96,25 96%
Gg-PH 18 Jam					
1	96	95	94	95	
2	96	94	94	94,67	
3	90	89	89	89,33	
4	90	90	89	89,67	
					92,17 92%

I.2 Foto Sel Neutrofil yang Memproduksi Radikal Superoksida Intra Seluler Kelompok Pra inkubasi, Inkubasi 1 dan 18 Jam

I.2.1 Kelompok Pra inkubasi (Pembesaran 1000x)

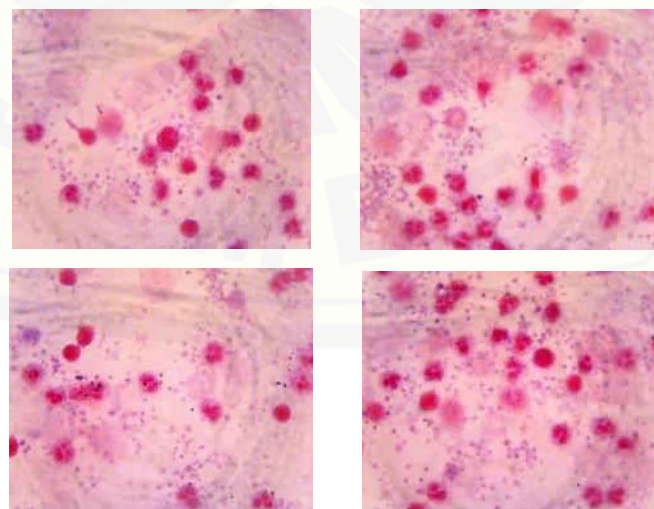
Neutrofil kelompok pra inkubasi tidak mendapat perlakuan inkubasi dan tidak dipapar antigen FMLP maupun protein antioksidan.

a. Kelompok Pra inkubasi (1)



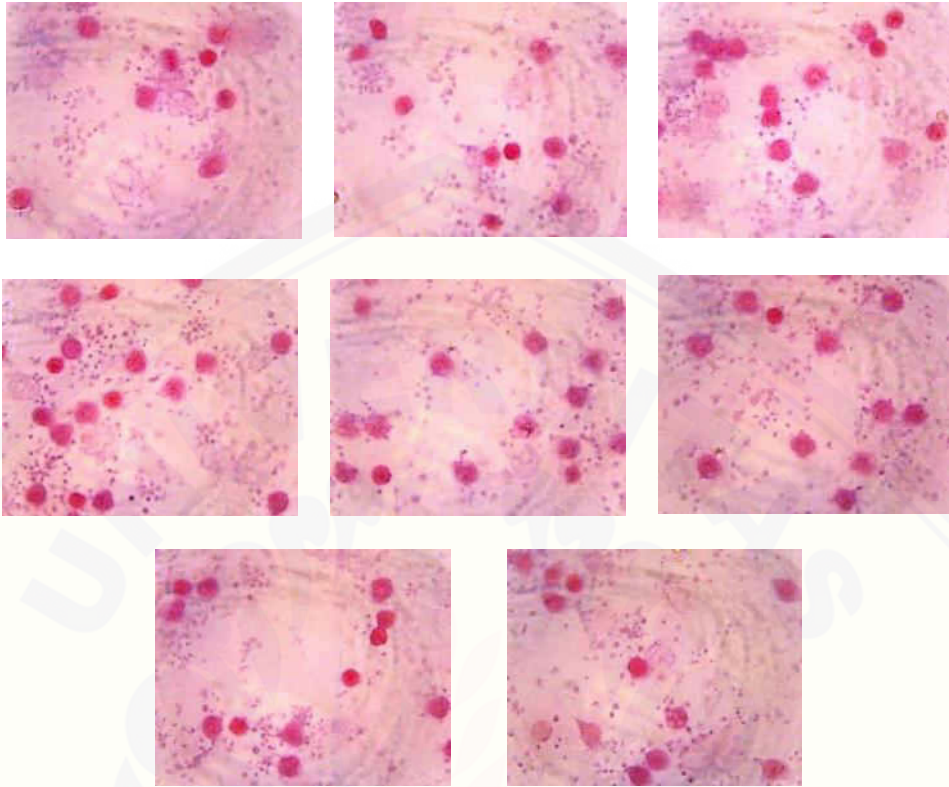
Pra inkubasi (1) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok Pra inkubasi (2)



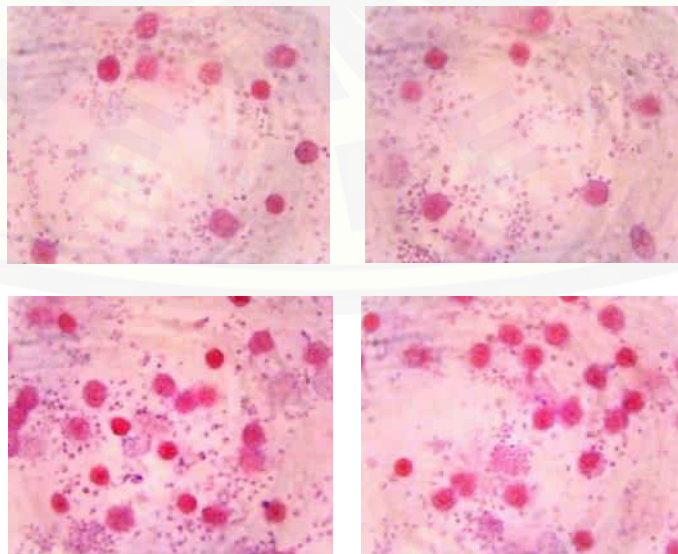
Pra inkubasi (2) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

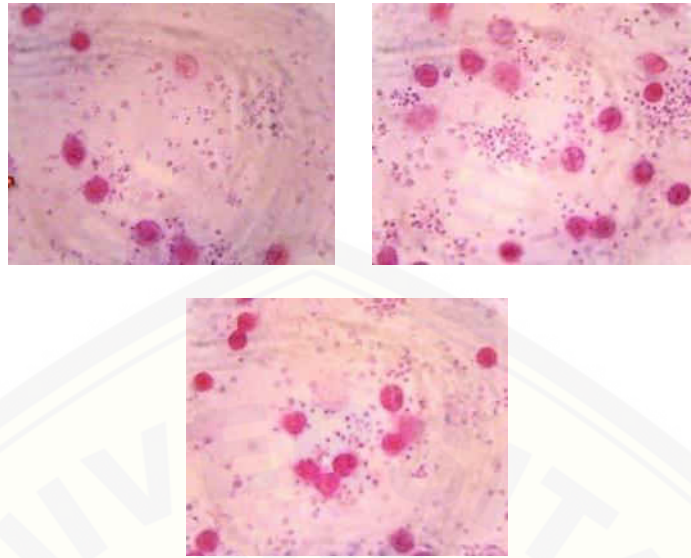
c. Kelompok Pra inkubasi (3)



Pra inkubasi (3) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

d. Kelompok Pra inkubasi (4)



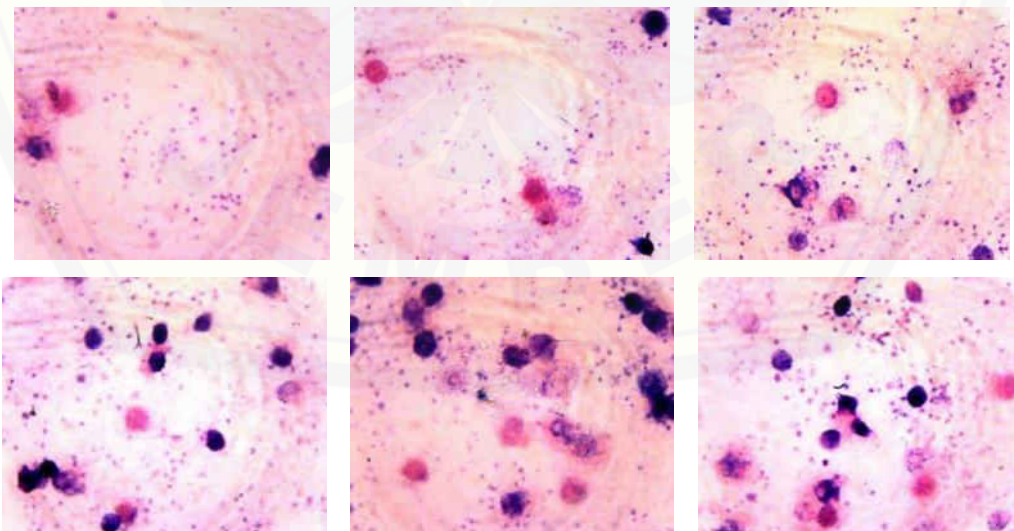


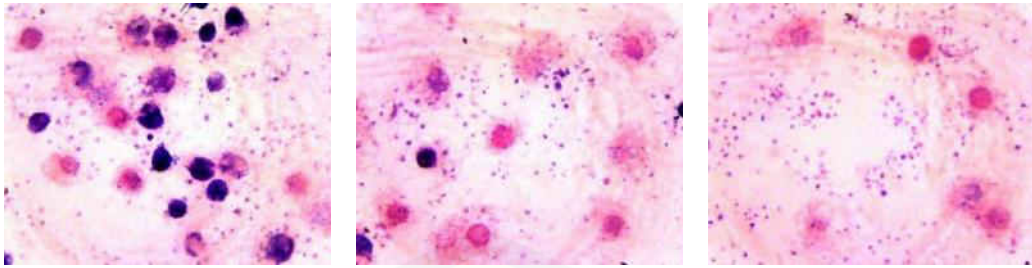
Pra inkubasi (4) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

I.2.2 Kelompok Inkubasi *Only* 1 Jam (Pembesaran 1000x)

Kelompok inkubasi *only* 1 jam hanya mendapat perlakuan inkubasi selama 1 jam tanpa paparan antigen FMLP maupun protein antioksidan.

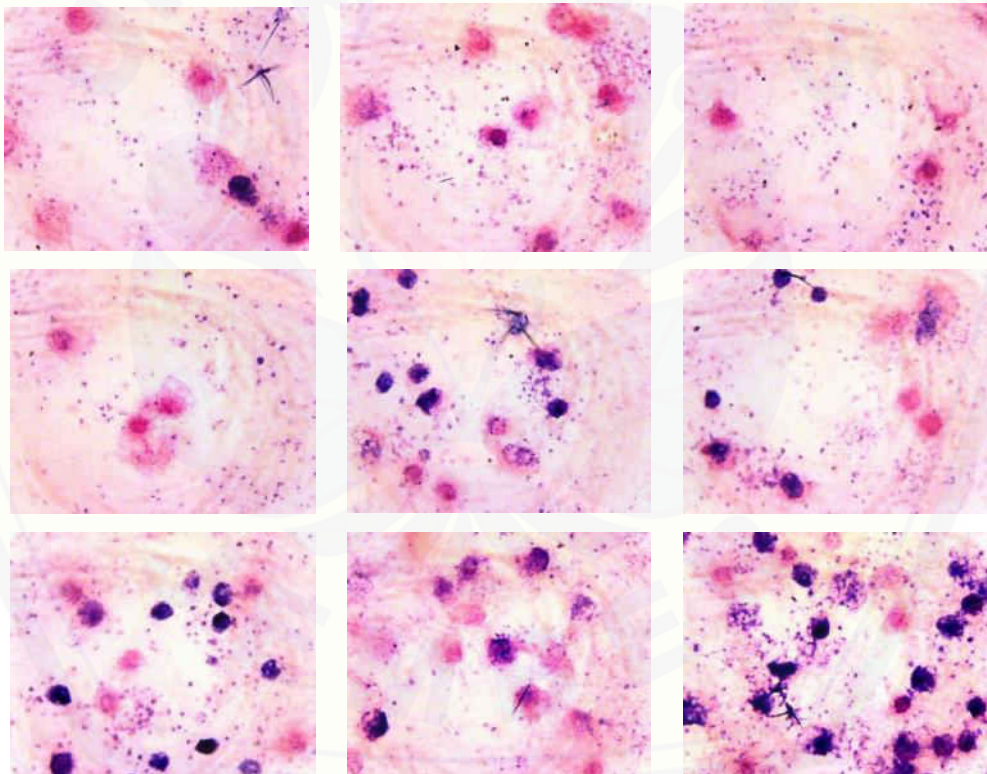
a. Kelompok Inkubasi *Only* 1 Jam (1)





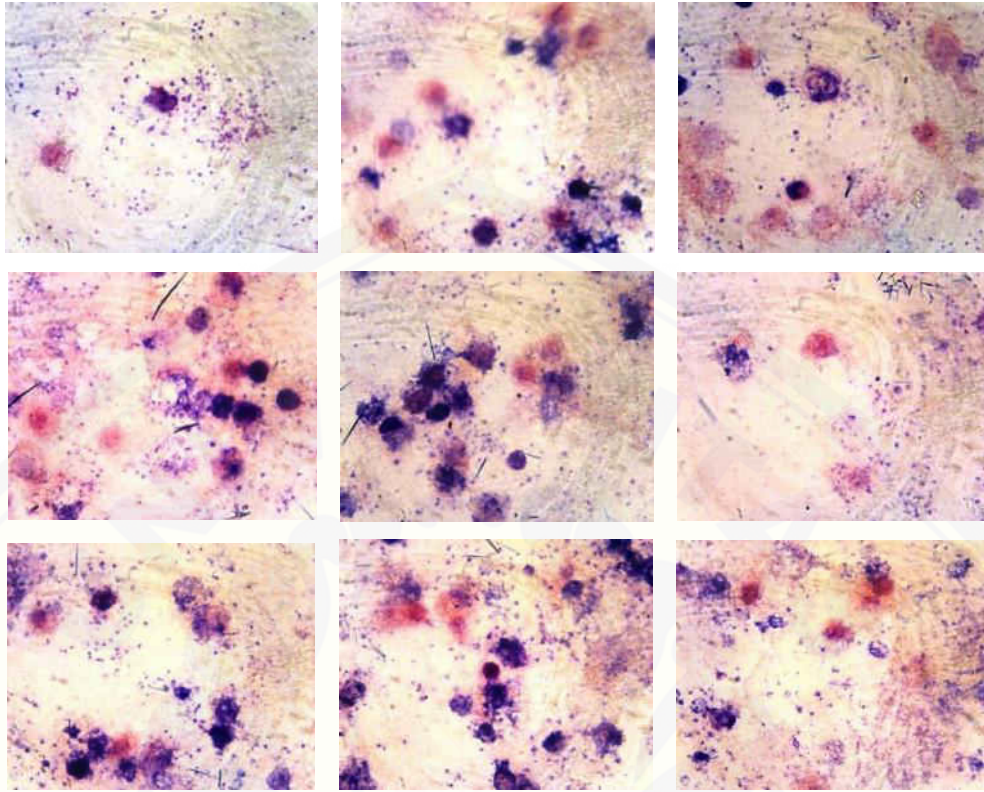
Inkubasi *only* 1 jam (1) sebagian neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler, sebagian neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok Inkubasi *Only* 1 Jam (2)



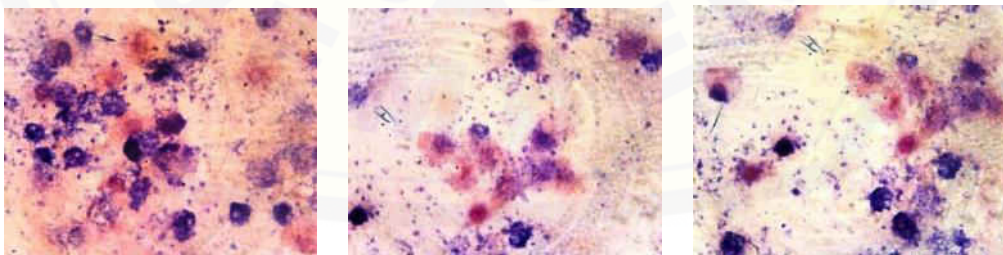
Inkubasi *only* 1 jam (2) sebagian neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler, sebagian neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

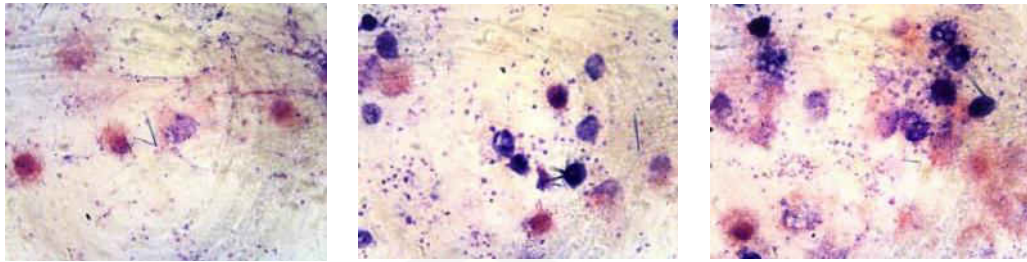
c. Kelompok Inkubasi *Only* 1 Jam (3)



Inkubasi *only* 1 jam (3) sebagian neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler, sebagian neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

d. Kelompok Inkubasi *Only* 1 Jam (4)

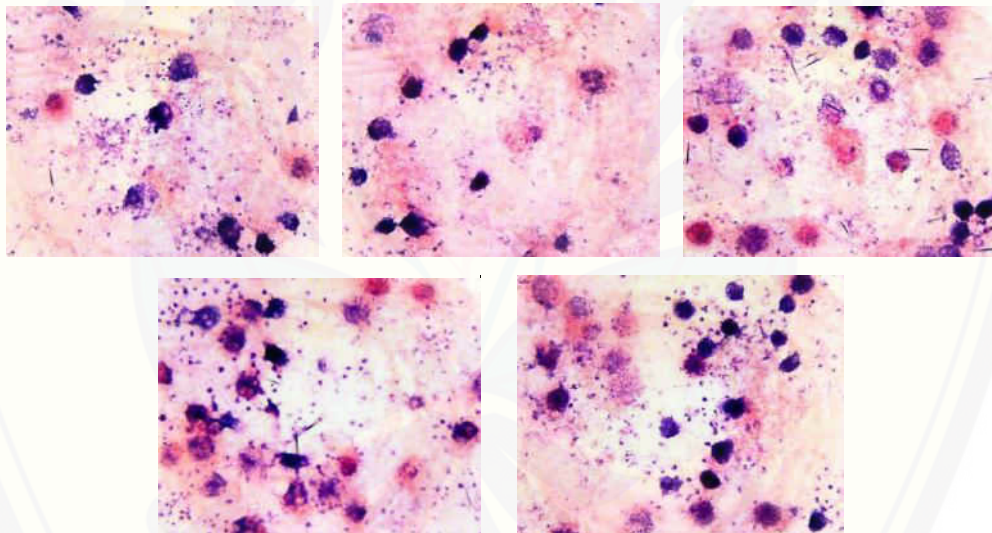




Inkubasi *only* 1 jam (4) sebagian neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler, sebagian neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

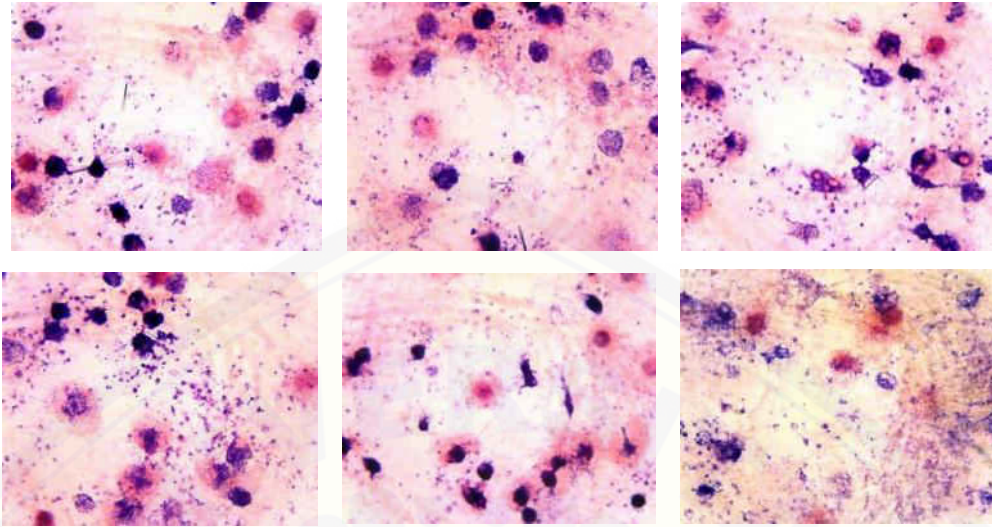
I.2.3 Kelompok FMLP Inkubasi 1 Jam (Pembesaran 1000x)

a. Kelompok FMLP Inkubasi 1 Jam (1)



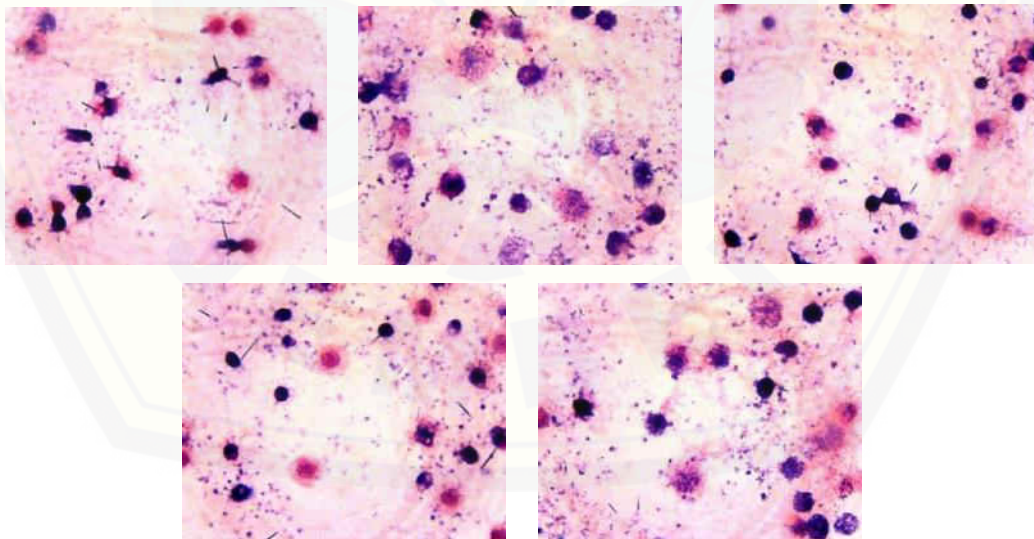
FMLP inkubasi 1 jam (1) sebagian besar neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok FMLP Inkubasi 1 Jam (2)



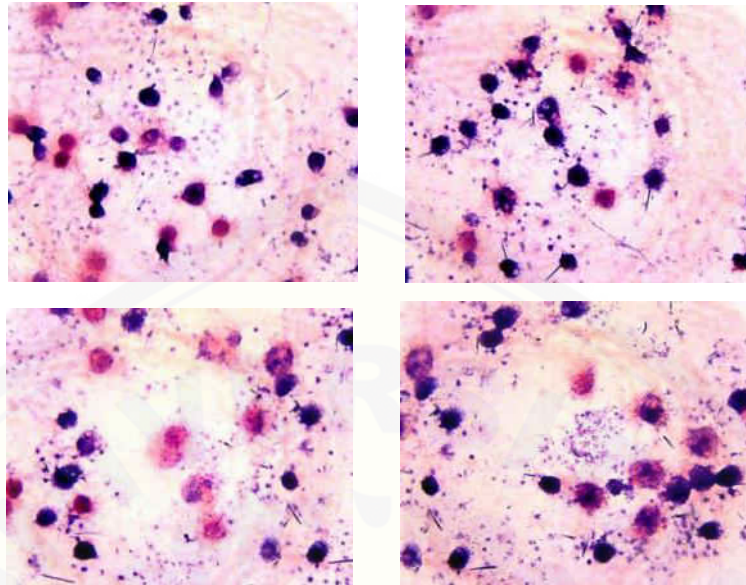
FMLP inkubasi 1 jam (2) sebagian besar neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

c. Kelompok FMLP Inkubasi 1 Jam (3)



FMLP inkubasi 1 jam (3) sebagian besar neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

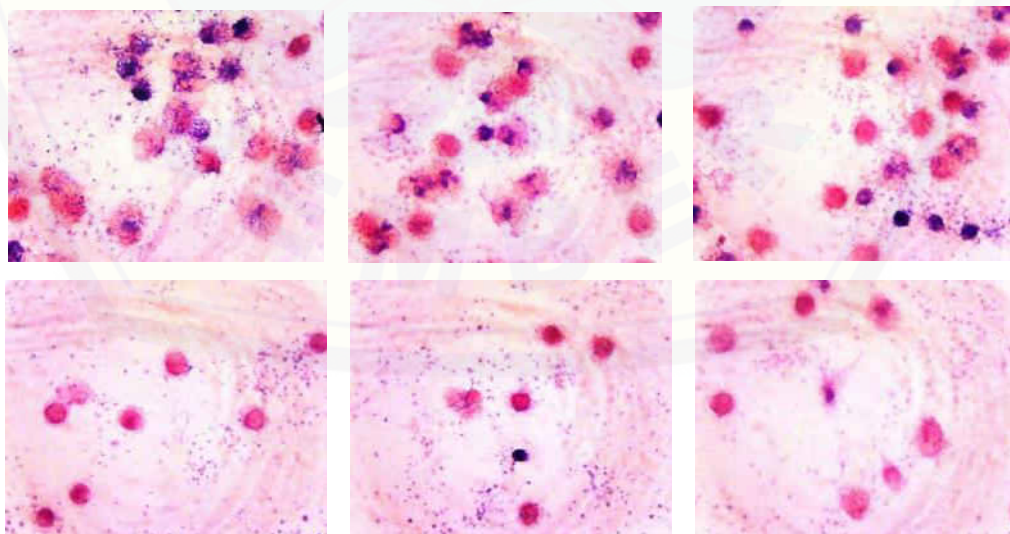
d. Kelompok FMLP Inkubasi 1 Jam (4)

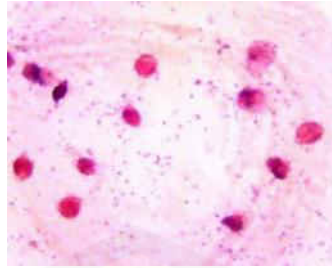


FMLP inkubasi 1 jam (4) sebagian besar neutrofil tampak berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

I.2.4 Kelompok GSH Inkubasi 1 Jam (Pembesaran 1000x)

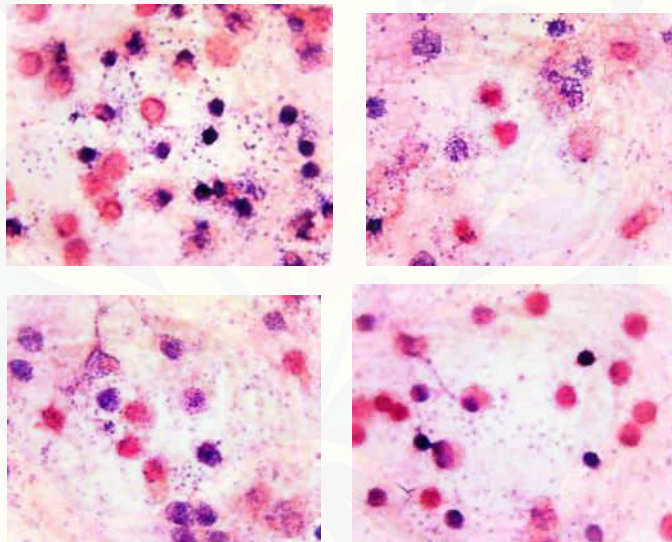
a. Kelompok GSH Inkubasi 1 Jam (1)





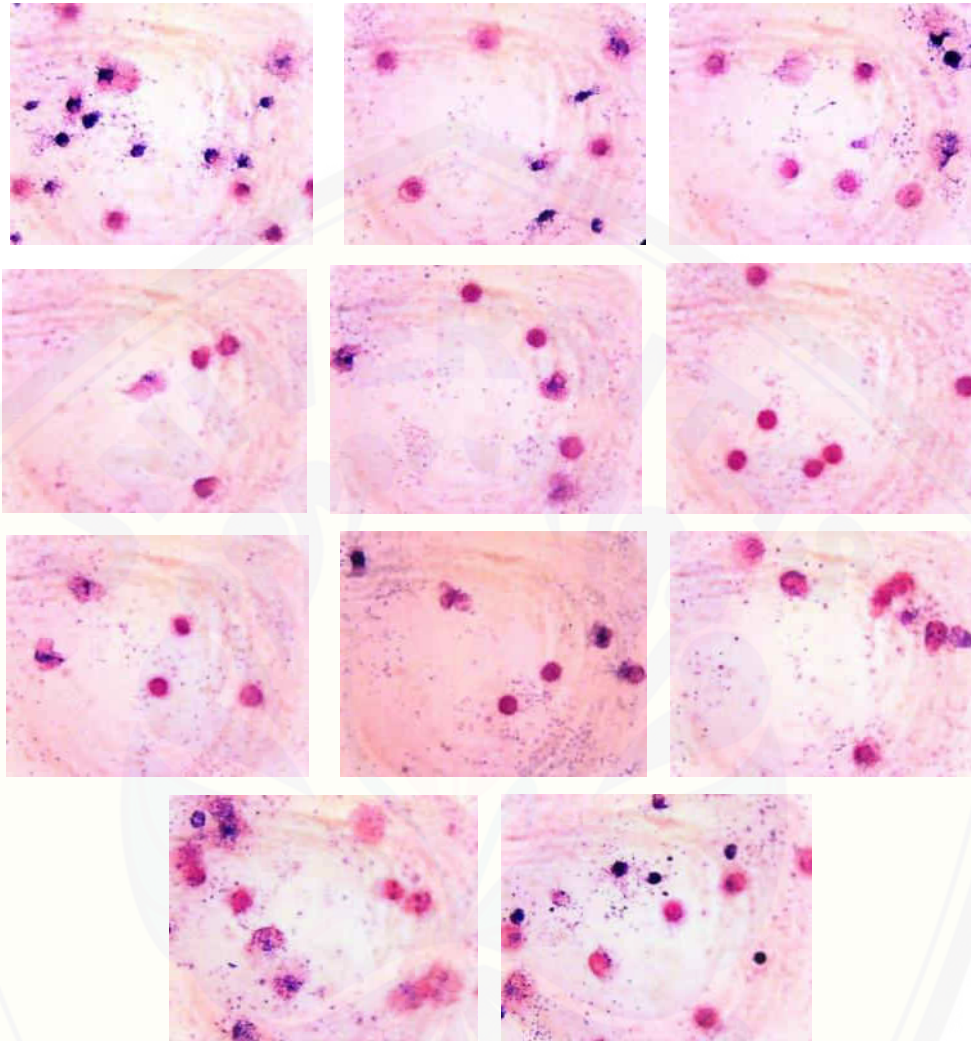
GSH inkubasi 1 jam (1) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok GSH Inkubasi 1 Jam (2)



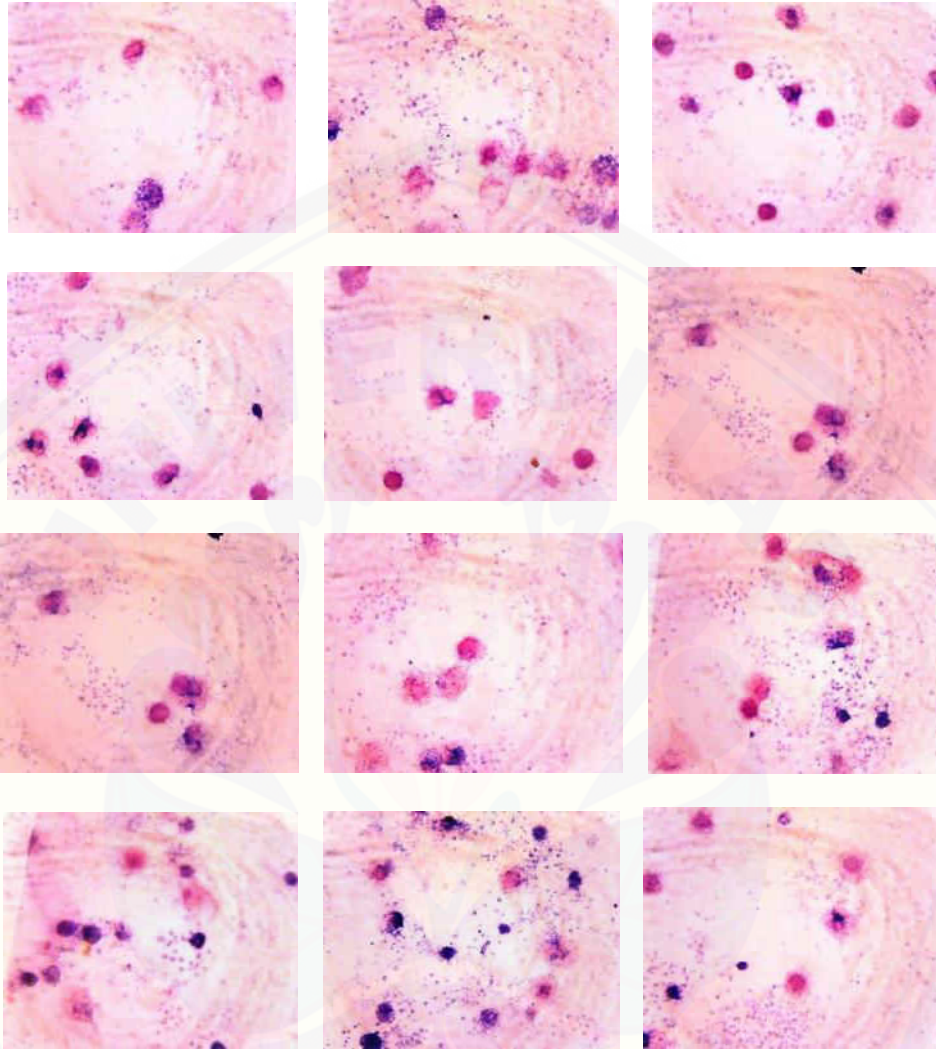
GSH inkubasi 1 jam (2) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

c. Kelompok GSH Inkubasi 1 Jam (3)



GSH inkubasi 1 jam (3) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

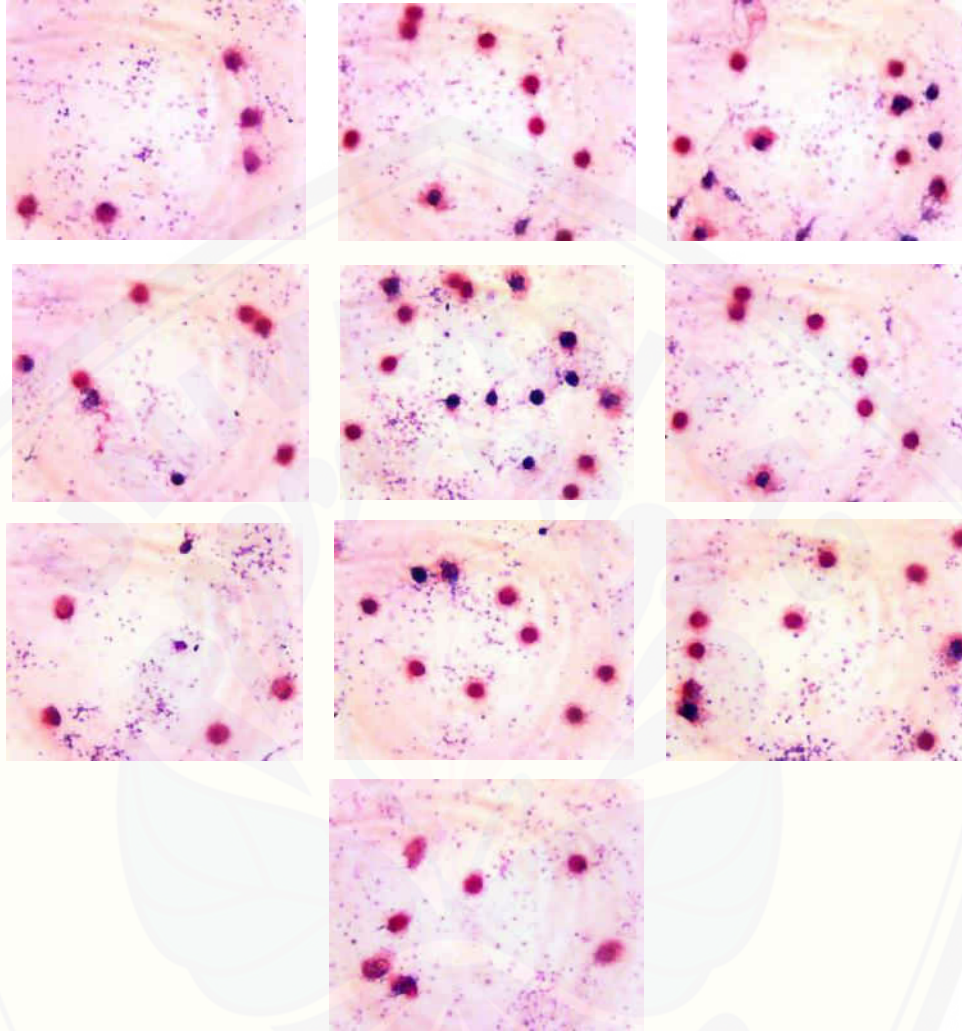
d. Kelompok GSH Inkubasi 1 Jam (4)



GSH inkubasi 1 jam (4) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

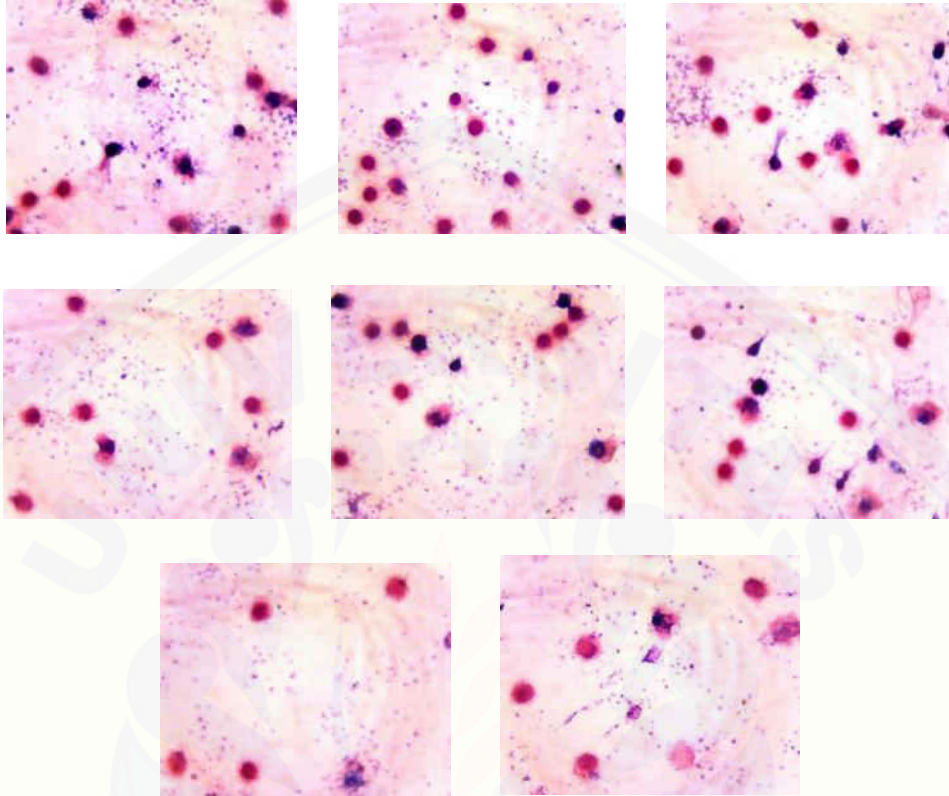
I.2.5 Kelompok Gg-PH Inkubasi 1 Jam (Pembesaran 1000x)

a. Kelompok Gg-PH Inkubasi 1 Jam (1)



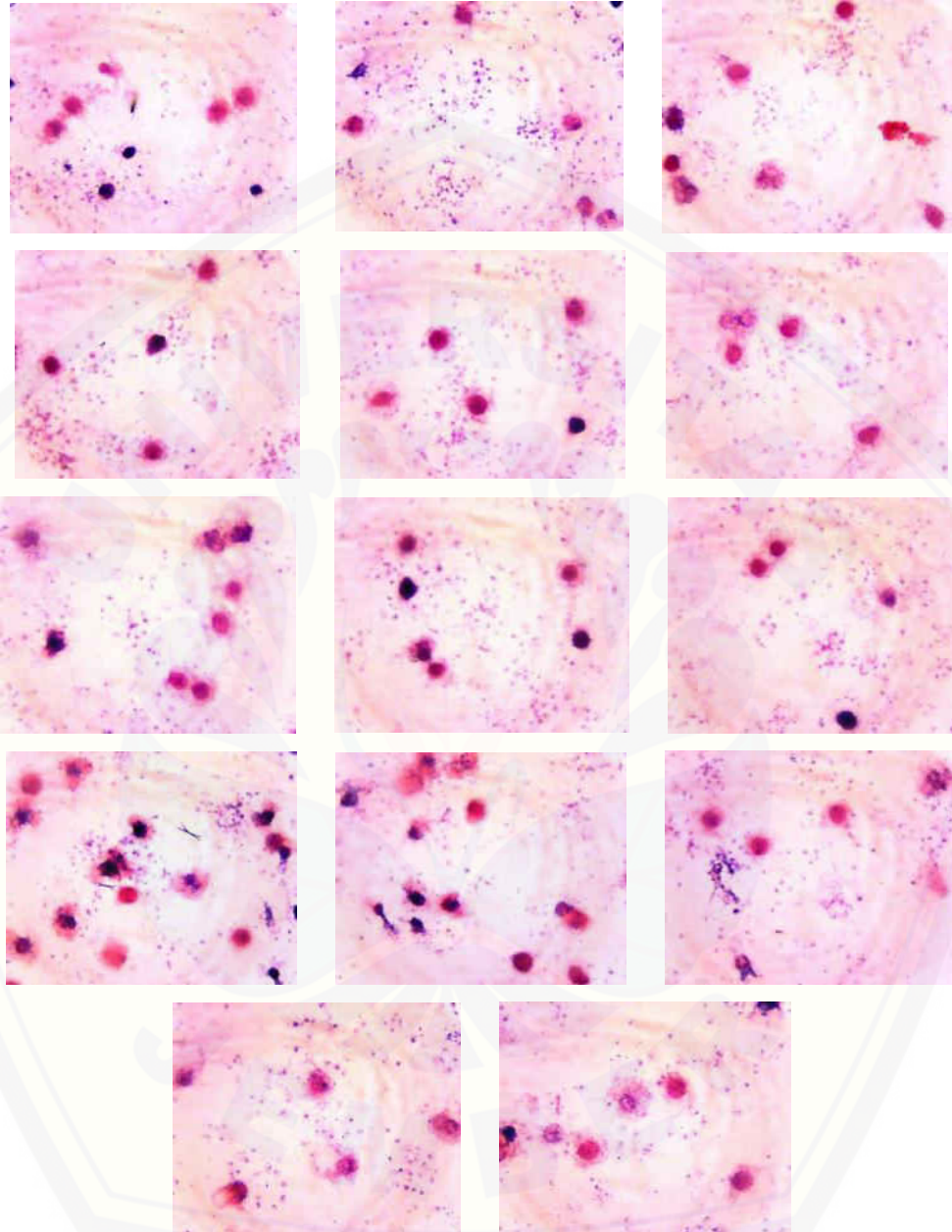
Gg-PH inkubasi 1 jam (1) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok Gg-PH Inkubasi 1 Jam (2)



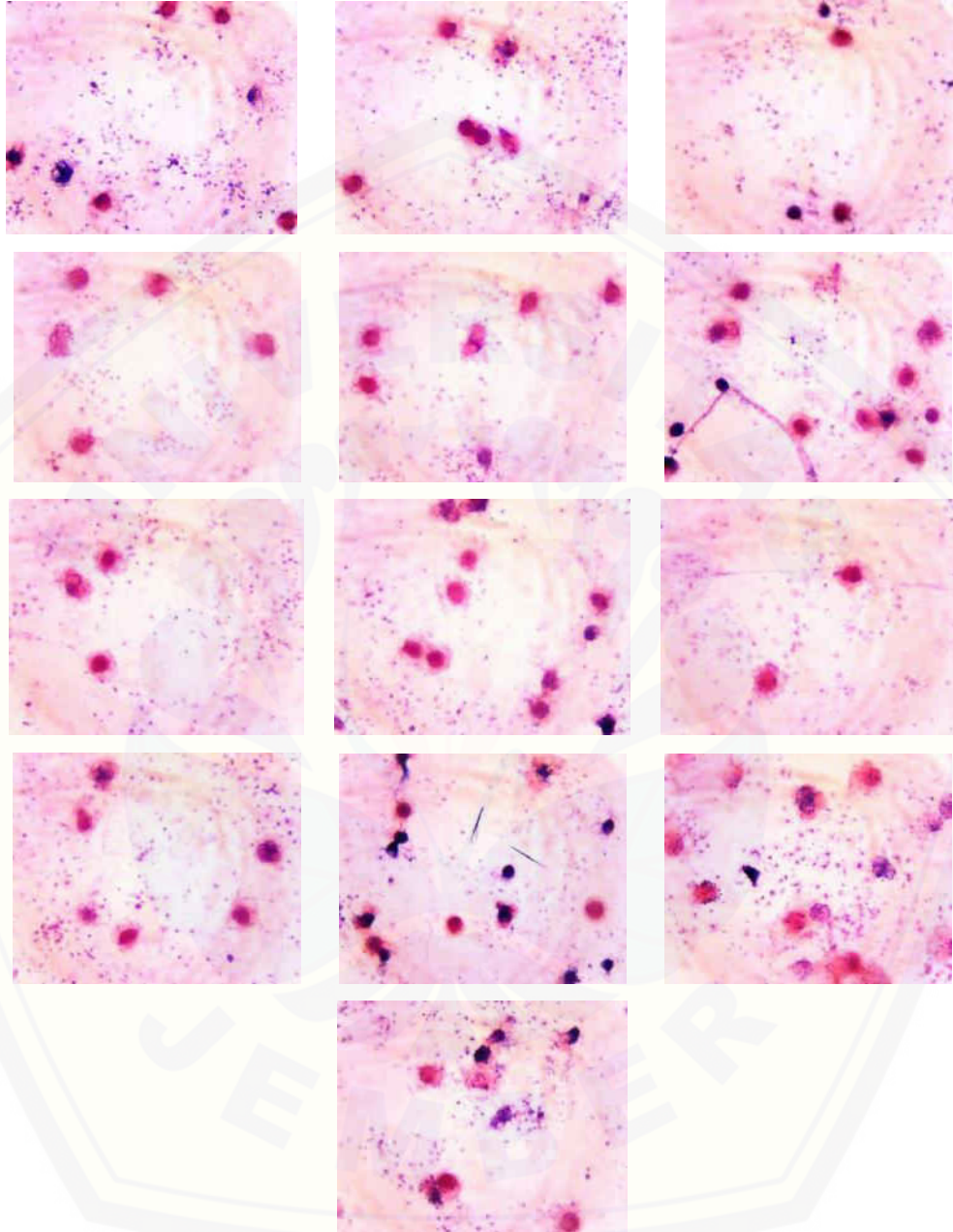
Gg-PH inkubasi 1 jam (2) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

c. Kelompok Gg-PH Inkubasi 1 Jam (3)



Gg-PH inkubasi 1 jam (3) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

d. Kelompok Gg-PH Inkubasi 1 Jam (4)

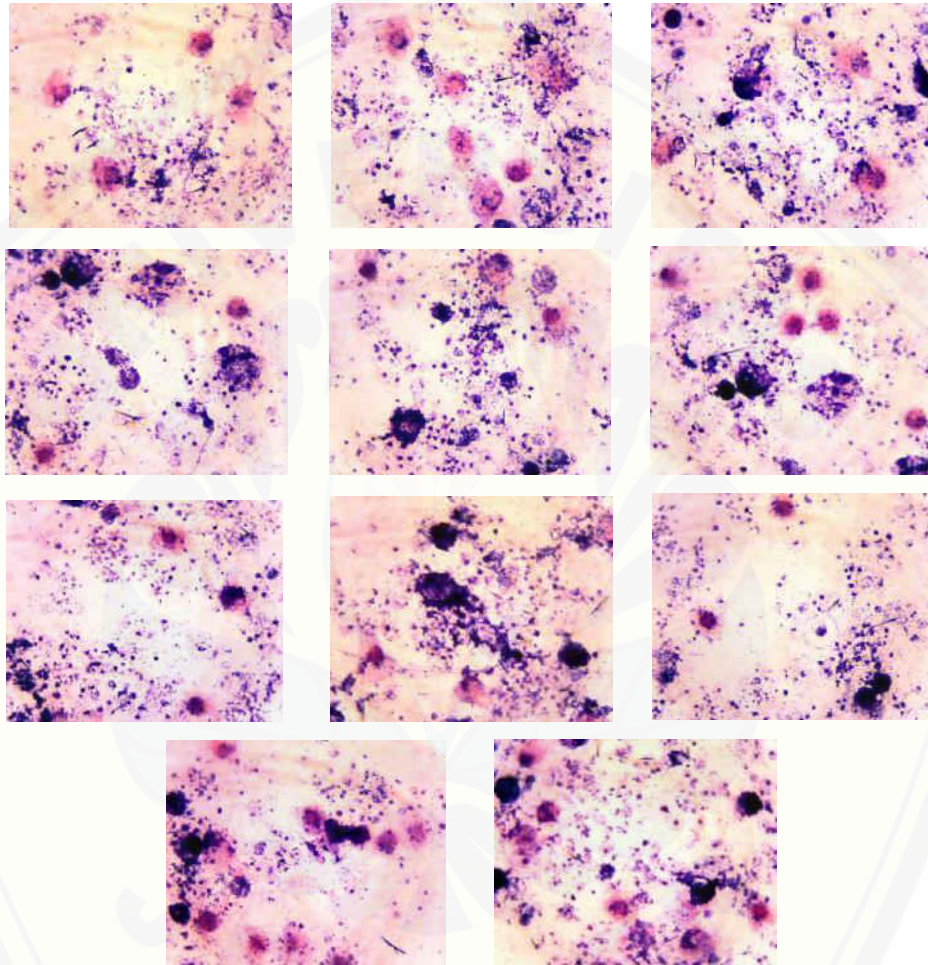


Gg-PH inkubasi 1 jam (4) sebagian besar neutrofil tampak berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Beberapa neutrofil berwarna biru menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

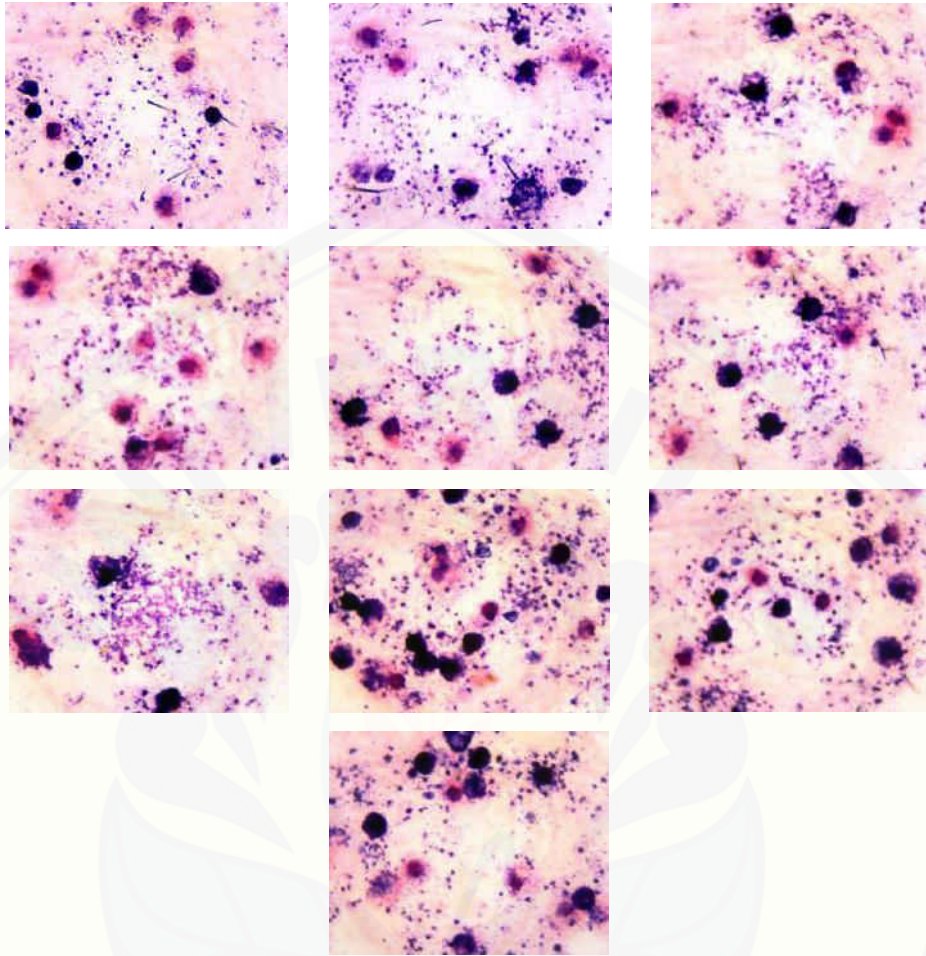
I.2.6 Kelompok Inkubasi *Only* 18 Jam (Pembesaran 1000x)

Kelompok inkubasi *only* 18 jam hanya mendapat perlakuan inkubasi selama 18 jam tanpa paparan antigen FMLP dan protein antioksidan.

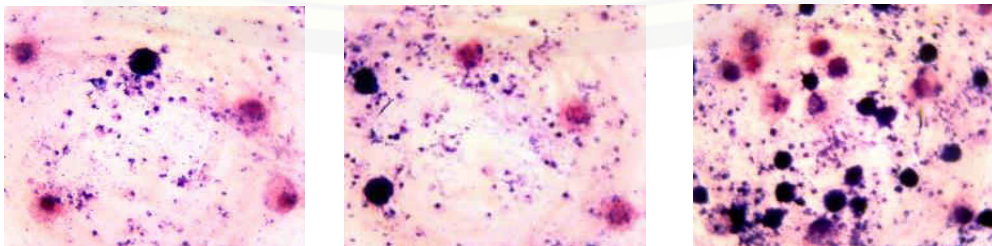
a. Kelompok Inkubasi *Only* 18 Jam (1)

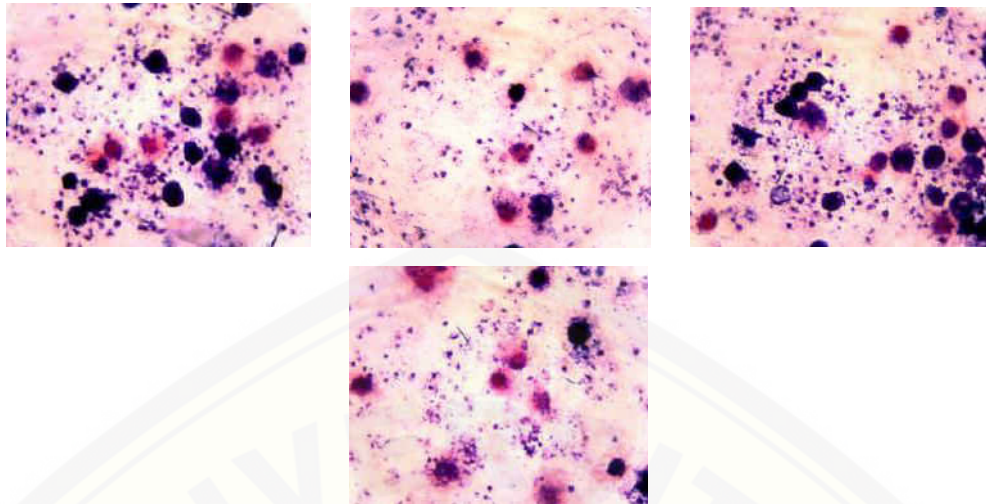


Inkubasi *only* 18 jam (1) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok Inkubasi *Only* 18 Jam (2)

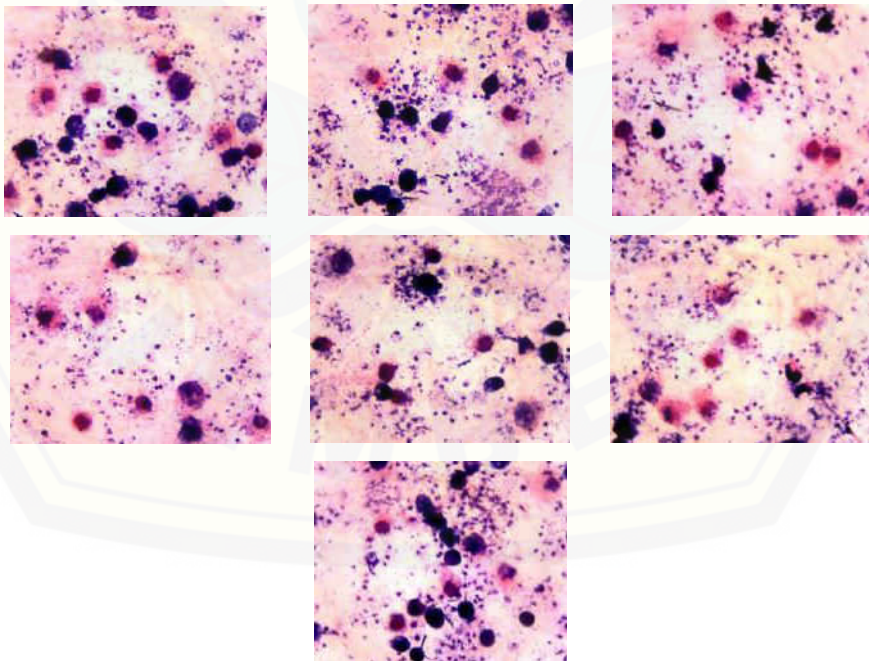
Inkubasi *only* 18 jam (2) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

c. Kelompok Inkubasi *Only* 18 Jam (3)



Inkubasi *only* 18 jam (3) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

d. Kelompok Inkubasi *Only* 18 Jam (4)

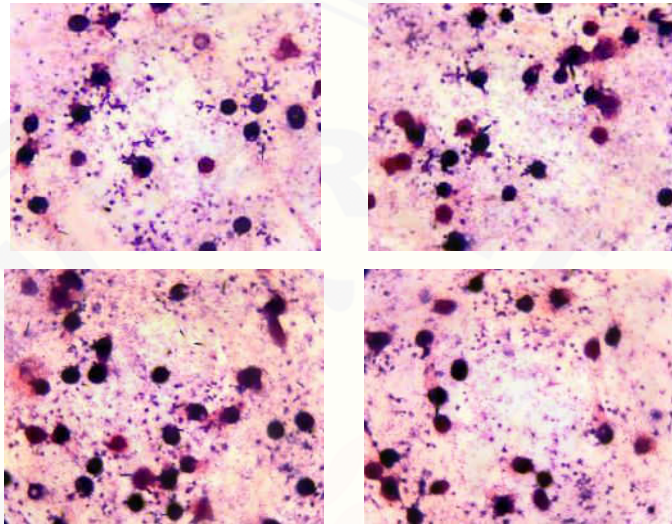


Inkubasi *only* 18 jam (4) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra

seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

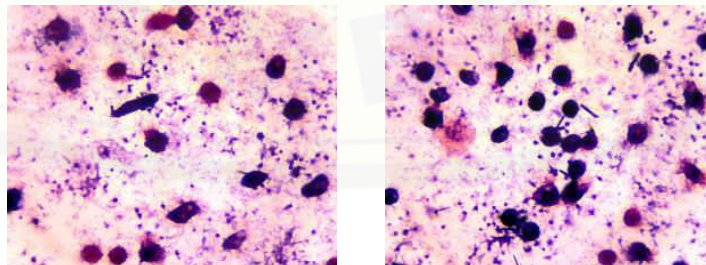
I.2.7 Kelompok FMLP Inkubasi 18 Jam (Pembesaran 1000x)

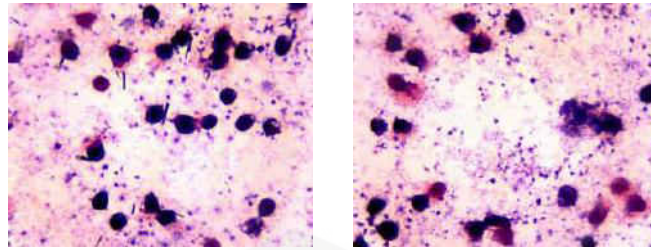
a. Kelompok FMLP Inkubasi 18 Jam (1)



FMLP inkubasi 18 jam (1) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

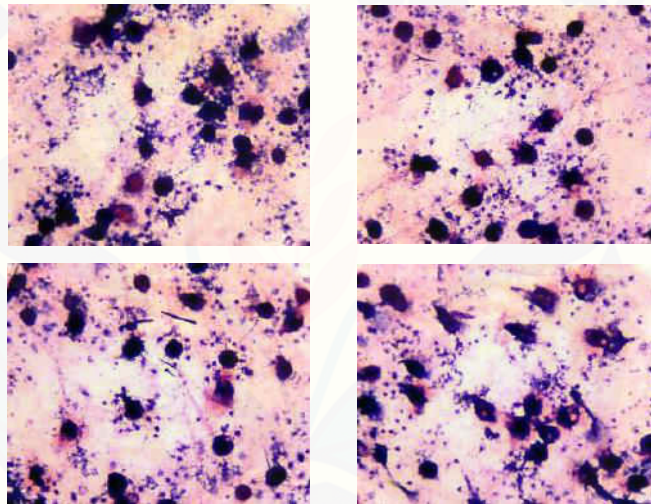
b. Kelompok FMLP Inkubasi 18 Jam (2)





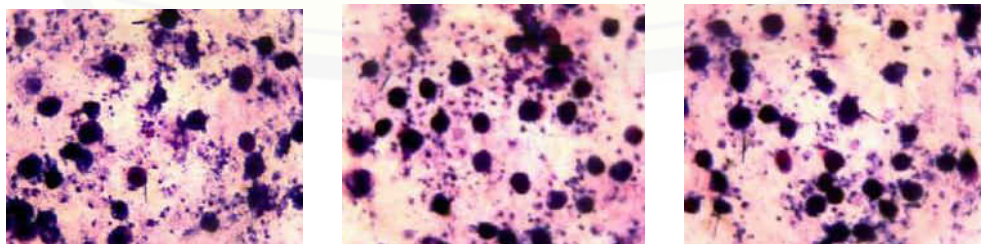
FMLP inkubasi 18 jam (2) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

c. Kelompok FMLP Inkubasi 18 Jam (3)



FMLP inkubasi 18 jam (3) semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler.

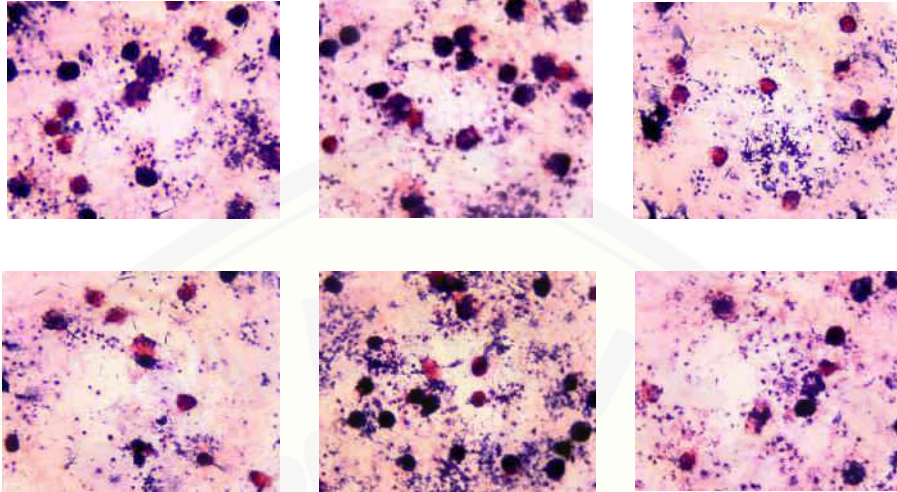
d. Kelompok FMLP Inkubasi 18 Jam (4)



FMLP inkubasi 18 jam (4) semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler.

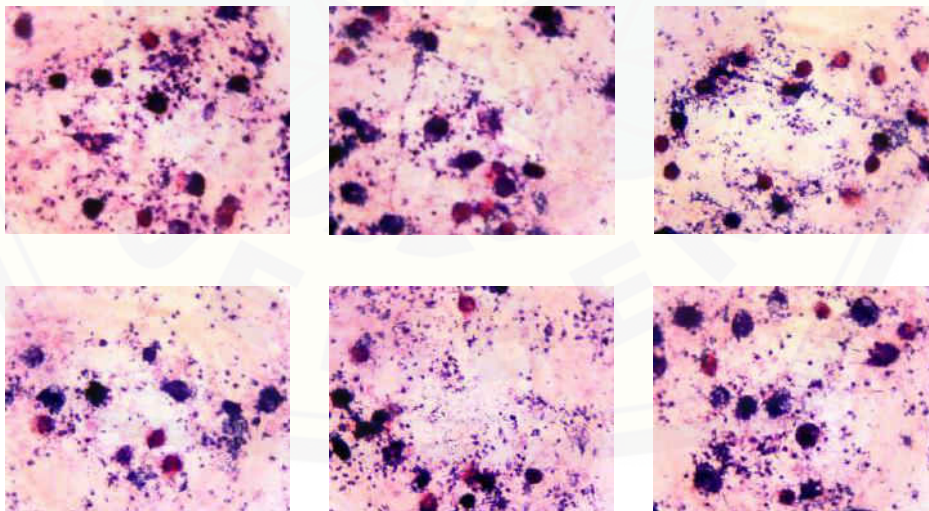
I.2.8 Kelompok GSH Inkubasi 18 Jam (1000x)

a. Kelompok GSH Inkubasi 18 Jam (1)



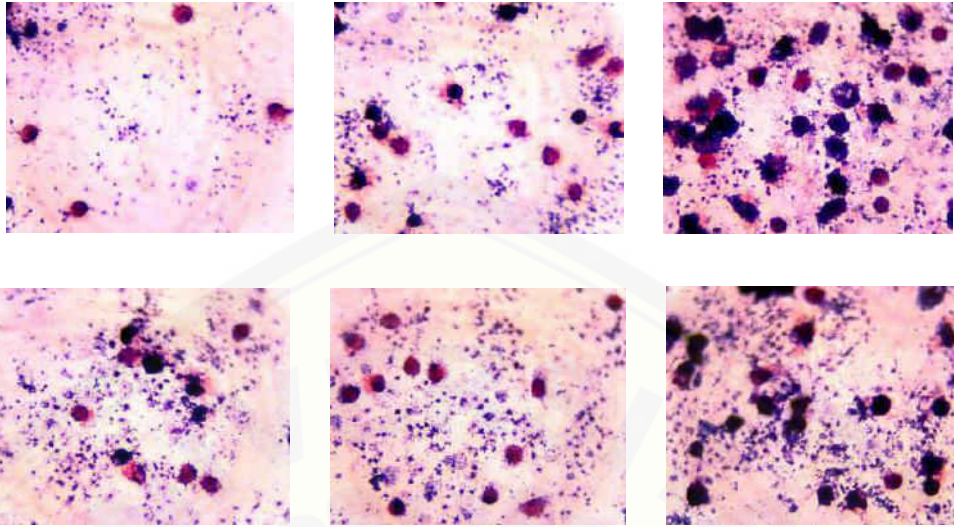
GSH inkubasi 18 jam (1) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

b. Kelompok GSH Inkubasi 18 Jam (2)



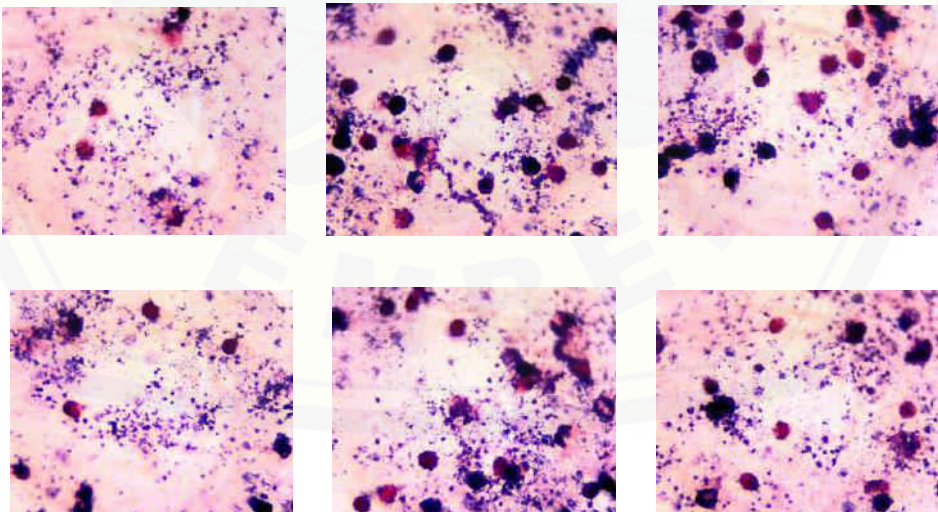
GSH inkubasi 18 jam (2) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

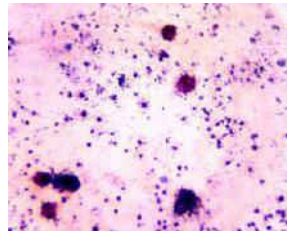
c. Kelompok GSH Inkubasi 18 Jam (3)



GSH inkubasi 18 jam (3) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

d. Kelompok GSH Inkubasi 18 Jam (4)

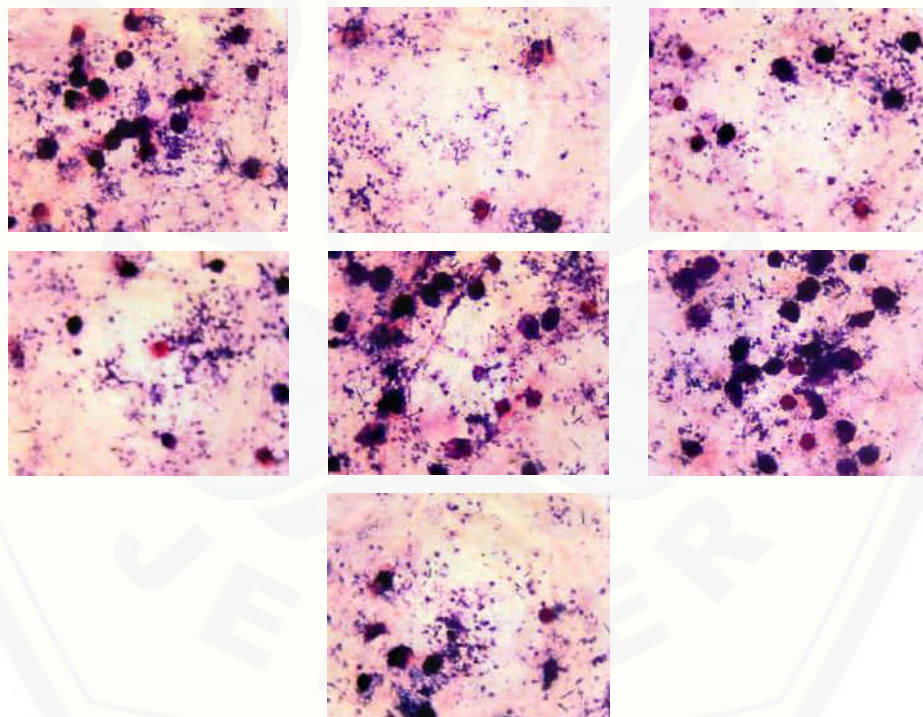




GSH inkubasi 18 jam (4) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

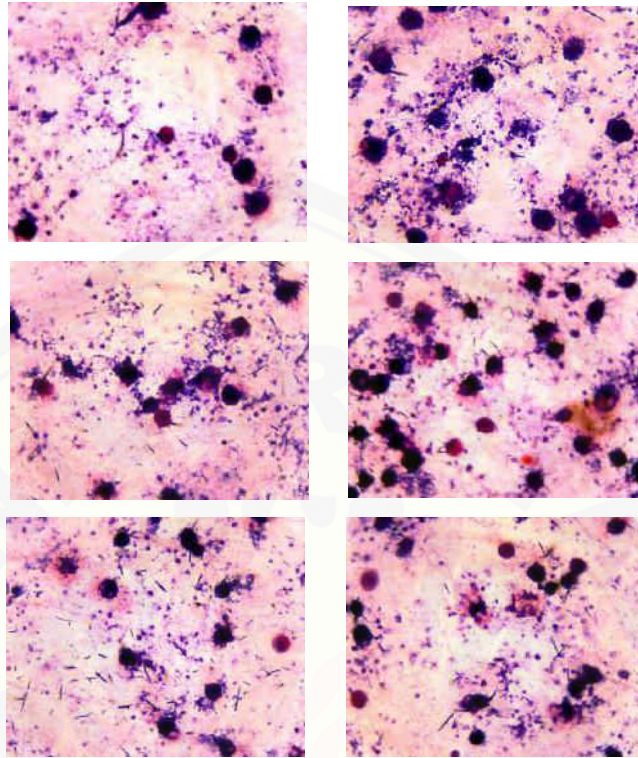
I.2.9 Kelompok Gg-PH Inkubasi 18 Jam (Pembesaran 1000x)

a. Kelompok Gg-PH Inkubasi 18 Jam (1)



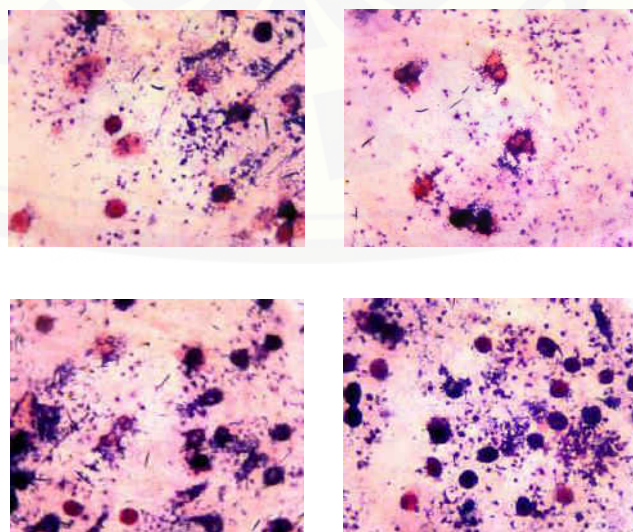
Gg-PH inkubasi 18 jam (1) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

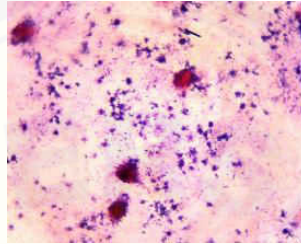
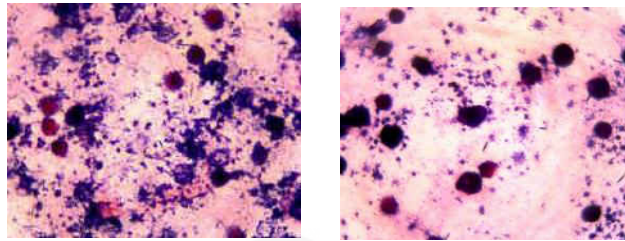
b. Kelompok Gg-PH Inkubasi 18 Jam (2)



Gg-PH inkubasi 18 jam (2) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

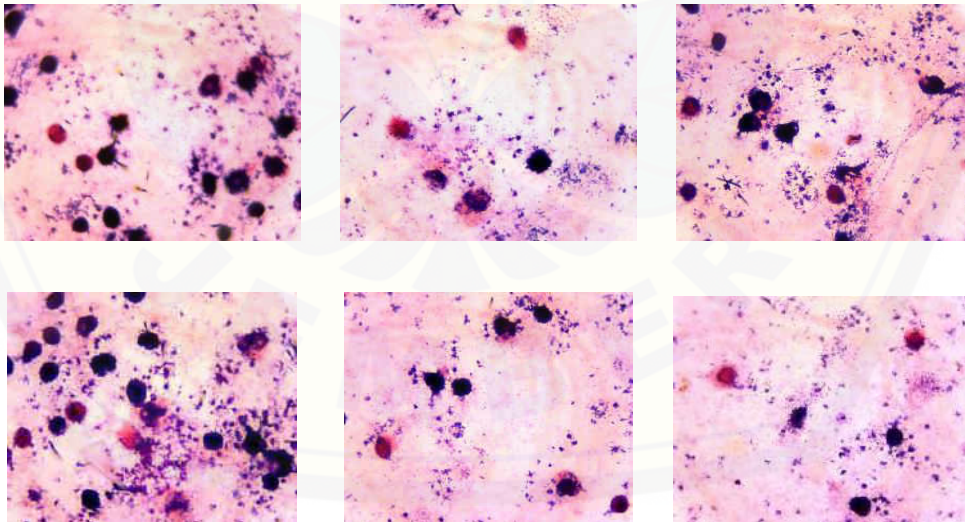
c. Kelompok Gg-PH Inkubasi 18 Jam (3)

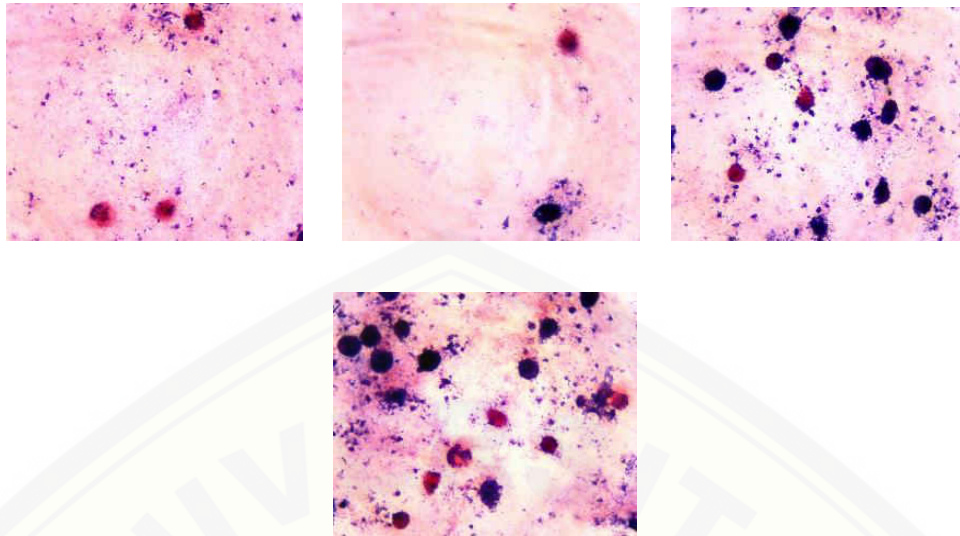




Gg-PH inkubasi 18 jam (3) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksinya radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksinya radikal superoksida intra seluler.

d. Kelompok Gg-PH Inkubasi 18 Jam (4)





Gg-PH inkubasi 18 jam (4) nyaris semua neutrofil berwarna biru dan beberapa tampak lisis yang menunjukkan diproduksi radikal superoksida intra seluler. Sedikit sekali neutrofil yang masih berwarna merah menunjukkan tidak diproduksi radikal superoksida intra seluler.

Lampiran J. Uji Superoksida Neutrofil Ekstra Seluler**J.1 Absorbansi radikal superoksida ekstra seluler pra inkubasi dan inkubasi 1 jam**

Kelompok	Absorbansi				Rerata	SD
	1	2	3	4		
Blank (HBSS)	0,037	0,033	0,035	0,036	0,035	0,00
Pra inkubasi	0,083	0,089	0,071	0,082	0,081	0,01
Inkubasi <i>only</i>	0,099	0,099	0,094	0,098	0,098	0,00
FMLP	0,122	0,122	0,131	0,136	0,128	0,01
GSH	0,328	0,318	0,324	0,329	0,325	0,00
Gg-PH	0,168	0,162	0,148	0,152	0,158	0,01

J.2 Absorbansi radikal superoksida ekstra seluler inkubasi 18 jam

Kelompok	Absorbansi				Rerata	SD
	1	2	3	4		
Blank (HBSS)	0,035	0,037	0,036	0,037	0,036	0,00
Inkubasi <i>only</i>	0,141	0,135	0,132	0,130	0,135	0,00
FMLP	0,232	0,183	0,182	0,183	0,195	0,02
GSH	0,332	0,173	0,364	0,360	0,307	0,09
Gg-PH	0,228	0,158	0,188	0,183	0,189	0,03

Lampiran K. Analisis Data

K.1 Jumlah Neutrofil yang Memproduksi Radikal Superoksida Intra Seluler

a. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
Kombinasi		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Data Transformasi	K- 1 jam	,338	4	.	,883	4	,351
	K- 18 jam	,297	4	.	,850	4	,227
	K+ 1 jam	,294	4	.	,859	4	,256
	K+ 18 jam	,401	4	.	,754	4	,042
	P 1 jam	,292	4	.	,915	4	,510
	P 18 jam	,293	4	.	,784	4	,076

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas *Levene Test*

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Data Transformasi	Based on Mean	,603	5	18	,698
	Based on Median	,549	5	18	,737
	Based on Median and with adjusted df	,549	5	11,895	,737
	Based on trimmed mean	,601	5	18	,700

c. *Univariate Analysis of Variance (Two Way Annova)*

Between-Subjects Factors			
		Value Label	N
Kelompok	1	K-	8
	2	K+	8
	3	P	8
Waktu	1	1 jam	12
	18	18 jam	12

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Data Transformasi

Kelompok	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
K-	1 jam	79,252	3,564	4
	18 jam	86,718	2,855	4
	Total	82,985	4,986	8
K+	1 jam	54,827	4,458	4
	18 jam	79,109	2,878	4
	Total	66,968	13,436	8
P	1 jam	46,196	3,175	4
	18 jam	73,979	3,340	4
	Total	60,088	15,154	8
Total	1 jam	60,092	15,014	12
	18 jam	79,935	6,115	12
	Total	70,013	15,114	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Data Transformasi

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5042,968 ^a	5	1008,594	86,156	,000
Intercept	117645,334	1	117645,334	10049,545	,000
Kelompok	2208,419	2	1104,209	94,324	,000
Waktu	2362,639	1	2362,639	201,822	,000
Kelompok * Waktu	471,910	2	235,955	20,156	,000
Error	210,718	18	11,707		
Total	122899,020	24			
Corrected Total	5253,686	23			

a. R Squared = ,960 (Adjusted R Squared = ,949)

d. Uji Lanjut *Post Hoc* LSD

- Kelompok Perlakuan

Estimates

Dependent Variable: Data Transformasi

Kelompok	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
K-	82,985	1,210	80,443	85,526
K+	66,968	1,210	64,427	69,509
P	60,088	1,210	57,546	62,629

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Data Transformasi

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	16,017*	1,711	,000	12,423	19,611
	P	22,897*	1,711	,000	19,303	26,491
K+	K-	-16,017*	1,711	,000	-19,611	-12,423
	P	6,880*	1,711	,001	3,286	10,474
P	K-	-22,897*	1,711	,000	-26,491	-19,303
	K+	-6,880*	1,711	,001	-10,474	-3,286

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

- Waktu Inkubasi

Estimates

Dependent Variable: Data Transformasi

Waktu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
1 jam	60,092	,988	58,017	62,167
18 jam	79,935	,988	77,860	82,010

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Data Transformasi

(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
1 jam	18 jam	-19,844*	1,397	,000	-22,778	-16,909
18 jam	1 jam	19,844*	1,397	,000	16,909	22,778

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

- Kombinasi Kelompok dan Waktu

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Data Transformasi

LSD

(I) Kombinasi	(J) Kombinasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K- 1 jam	K- 18 jam	-7,466*	2,419	,006	-12,548	-2,383
	K+ 1 jam	24,425*	2,419	,000	19,342	29,508
	K+ 18 jam	,143	2,419	,954	-4,940	5,226
	P 1 jam	33,056*	2,419	,000	27,973	38,139
	P 18 jam	5,273*	2,419	,043	,190	10,356
K- 18 jam	K- 1 jam	7,466*	2,419	,006	2,383	12,548
	K+ 1 jam	31,891*	2,419	,000	26,808	36,974
	K+ 18 jam	7,609*	2,419	,006	2,526	12,691
	P 1 jam	40,522*	2,419	,000	35,439	45,604
	P 18 jam	12,738*	2,419	,000	7,655	17,821
K+ 1 jam	K- 1 jam	-24,425*	2,419	,000	-29,508	-19,342
	K- 18 jam	-31,891*	2,419	,000	-36,974	-26,808
	K+ 18 jam	-24,282*	2,419	,000	-29,365	-19,199
	P 1 jam	8,631*	2,419	,002	3,548	13,714
	P 18 jam	-19,153*	2,419	,000	-24,235	-14,070
K+ 18 jam	K- 1 jam	-,143	2,419	,954	-5,226	4,940
	K- 18 jam	-7,609*	2,419	,006	-12,691	-2,526
	K+ 1 jam	24,282*	2,419	,000	19,199	29,365
	P 1 jam	32,913*	2,419	,000	27,830	37,996
	P 18 jam	5,130*	2,419	,048	,047	10,213
P 1 jam	K- 1 jam	-33,056*	2,419	,000	-38,139	-27,973
	K- 18 jam	-40,522*	2,419	,000	-45,604	-35,439
	K+ 1 jam	-8,631*	2,419	,002	-13,714	-3,548
	K+ 18 jam	-32,913*	2,419	,000	-37,996	-27,830
	P 18 jam	-27,783*	2,419	,000	-32,866	-22,700
P 18 jam	K- 1 jam	-5,273*	2,419	,043	-10,356	-,190
	K- 18 jam	-12,738*	2,419	,000	-17,821	-7,655
	K+ 1 jam	19,153*	2,419	,000	14,070	24,235
	K+ 18 jam	-5,130*	2,419	,048	-10,213	-,047
	P 1 jam	27,783*	2,419	,000	22,700	32,866

*. The mean difference is significant at the .05 level.

K.2 Absorbansi Medium Neutrofil (Radikal Superoksida Ekstra Seluler Neutrofil)

a. Uji Normalitas *Shapiro Wilk*

Tests of Normality

Absorbansi	Kombinasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	K- 1 jam	,296	4	.	,854	4	,240
	K- 18 jam	,437	4	.	,647	4	,002
	K+ 1 jam	,243	4	.	,905	4	,457
	K+ 18 jam	,358	4	.	,750	4	,039
	P 1 jam	,226	4	.	,946	4	,691
	P 18 jam	,267	4	.	,951	4	,722

a. Lilliefors Significance Correction

b. Uji Homogenitas *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
Absorbansi	Based on Mean	1,651	5	18	,212
	Based on Median	,247	5	18	,624
	Based on Median and with adjusted df	,247	5	3,997	,624
	Based on trimmed mean	1,523	5	18	,230

c. *Univariate Analysis of Variance (Two Way Anova)*

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Kelompok	1	K-	8
	2	K+	8
	3	P	8
Waktu	1	1 jam	12
	18	18 jam	12

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Absorbansi

Kelompok	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
K-	1 jam	,12775	,006946	4
	18 jam	,19500	,024671	4
	Total	,16138	,039670	8
K+	1 jam	,32475	,004992	4
	18 jam	,30725	,090625	4
	Total	,31600	,060150	8
P	1 jam	,15750	,009147	4
	18 jam	,18925	,028976	4
	Total	,17338	,026148	8
Total	1 jam	,20333	,090801	12
	18 jam	,23050	,076511	12
	Total	,21692	,083279	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Absorbansi

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	,130 ^a	5	,026	15,896	,000
Intercept	1,129	1	1,129	690,121	,000
Kelompok	,118	2	,059	36,174	,000
Waktu	,004	1	,004	2,706	,117
Kelompok * Waktu	,007	2	,004	2,214	,138
Error	,029	18	,002		
Total	1,289	24			
Corrected Total	,160	23			

a. R Squared = ,815 (Adjusted R Squared = ,764)

d. Uji Lanjut *Post Hoc* LSD

- Kelompok

Estimates

Dependent Variable: Absorbansi

Kelompok	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
K-	,161	,014	,131	,191
K+	,316	,014	,286	,346
P	,173	,014	,143	,203

Pairwise Comparisons

Dependent Variable: Absorbansi

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^a	95% Confidence Interval for Difference ^a	
					Lower Bound	Upper Bound
K-	K+	-,155*	,020	,000	-,197	-,112
	P	-,012	,020	,560	-,054	,030
K+	K-	,155*	,020	,000	,112	,197
	P	,143*	,020	,000	,100	,185
P	K-	,012	,020	,560	-,030	,054
	K+	-,143*	,020	,000	-,185	-,100

Based on estimated marginal means

*. The mean difference is significant at the ,05 level.

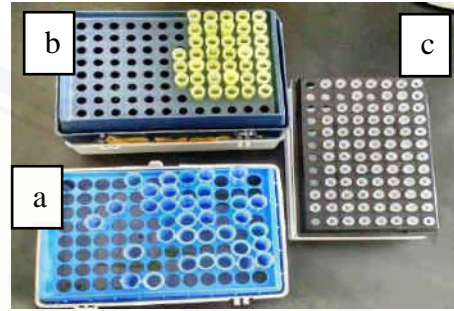
a. Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Lampiran L. Alat dan Bahan Penelitian

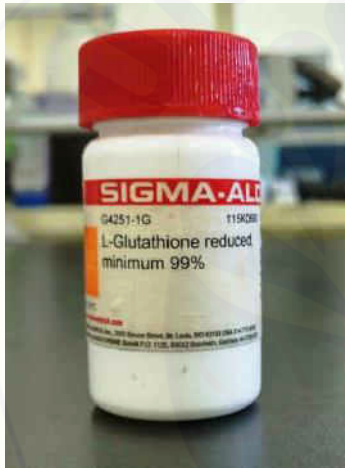
L.1 Alat dan Bahan Hidrolisis, Uji ABTS, dan Pirogalol Protein Biji Melinjo Terhidrolisis



Biji melinjo kupasan kulit kedua



(a) Blue tip, (b) yellow tip, (c) white tip



Glutathion (GSH)



Radikal Pirogalol



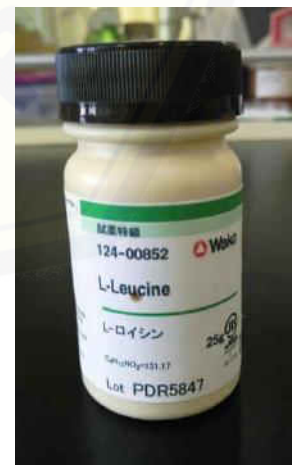
Radikal ABTS



Bradford



TNBS



L-leucine



Buffer Na Fosfat pH 8 0,2 M



Aquadidest steril



Spektrofotometer Mapada V1100D



Spektrofotometer Uv-Vis Hitachi U-2900



Centrifuse Hitachi CF15RXII



Centrifuse Hitachi CR21GIII



Water bath



Dry block heater



Neraca Precisa $e = 0,1 \text{ g}$



Neraca ES-225SM-DR $e = 1 \text{ mg}$



Stirrer



pH meter



Vortex



Ruang asam



Mikro pipet

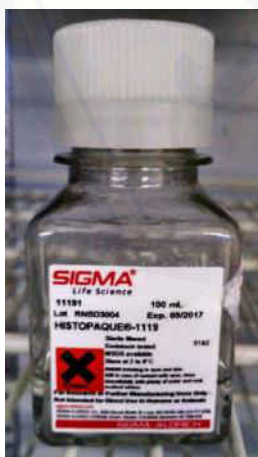


Freezer 4⁰C



Blender

L.2 Alat dan Bahan Penelitian Uji Superoksida Neutrofil



Histopaque 1119



Lymphocyte Separation Medium (d=1077)



Antigen fMLP



Nitroblue Tetrazolium



Penicilin- Streptomycin



Fungzone Amphotericin



HBSS



Giemsa



Safranin



Methanol absolute



Aquabidest steril



Alkohol 70%



(a) *Blue tip*, (b) *Eppendorf 2 mL*,
(c) *Yellow tip*, (d) *White tip*



Tabung falcon



Tabung heparin



Mikro pipet



(a) *Micro filter 0,2 µm*, (b) *Syringe 5 mL*



Well plate (12 chambers)



Centrifuge 5810 R



Microplate reader



Inkubator *Shaker*



Neraca digital $d=0,01$ g



Oven



Mikroskop *inverted* dan komputer



Laminar flow

Lampiran M. Foto Penelitian

M.1 Foto Penelitian Hidrolisis, Uji ABTS, dan Pirogalol Protein Biji Melinjo Terhidrolisis



Ekstraksi biji melinjo



Hasil ekstrak biji melinjo



Protein Kasar Biji Melinjo (Gg-PK)



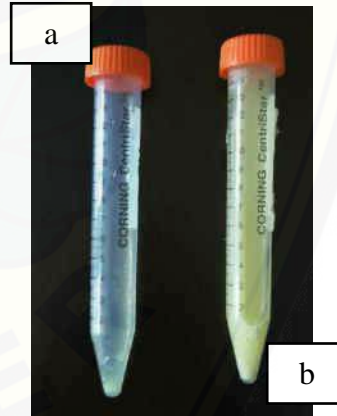
Gg-PK diatur pH menjadi 8



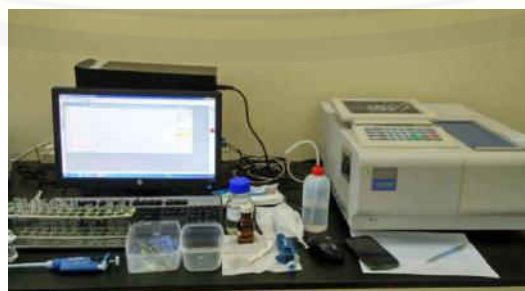
Gg-PK pH 8



Pellet hasil sentrifugasi Gg-PK



(a) Gg-PH, (b) Gg-PI



Spektrofotometer Radikal Pirogalol

M.2 Foto Penelitian Uji Superoksida Neutrofil



Pengambilan darah vena peripheral (Vena Cubiti)



Heparinized Blood



Sentrifugasi 600 rpm untuk mengurangi kontaminasi platelet



Hasil sentrifugasi, (a) plasma darah, (b) sel darah



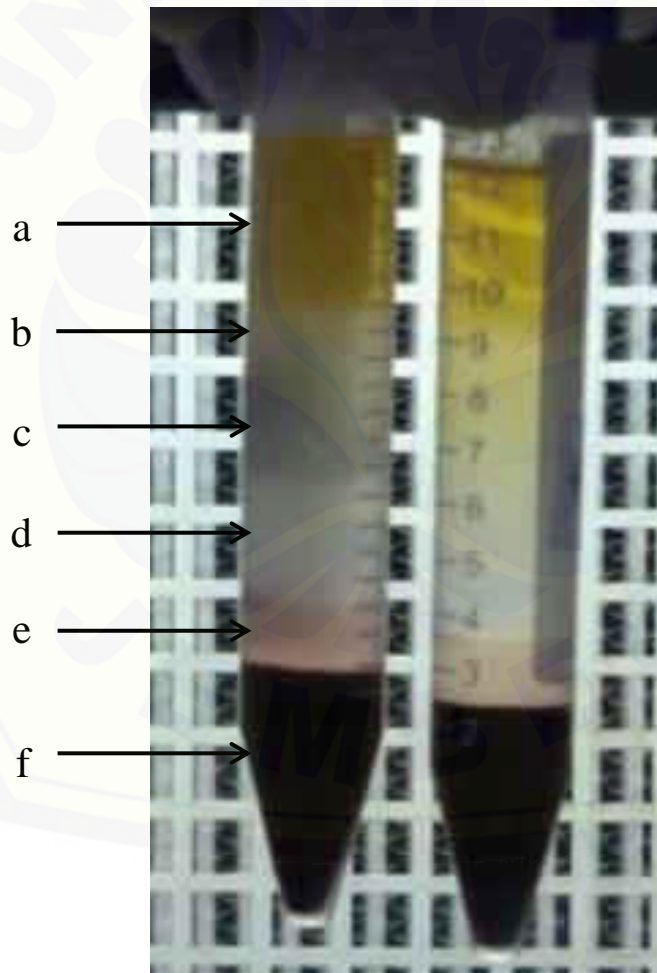
Aspirasi plasma & sel darah



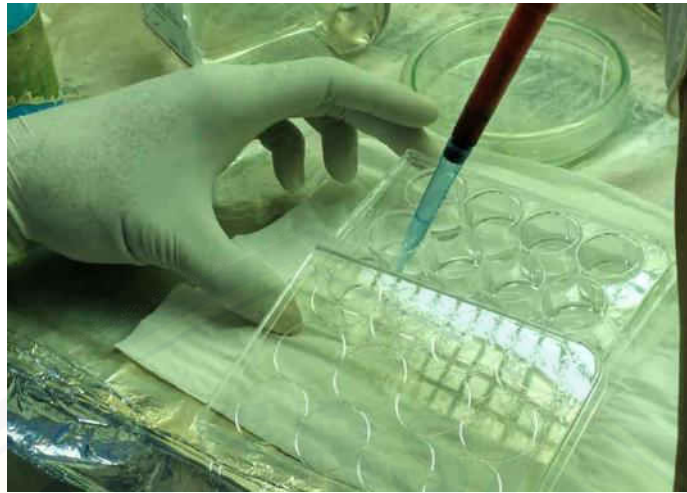
Pelapisan darah diatas gradient *ficoll*



Sentrifugasi 1900 rpm 30 menit suhu ruang



Hasil sentrifugasi 1900 rpm, (a) Plasma, (b) *Buffy coat* monosit, (c) LSM, (d) *Buffy coat* neutrofil, (e) *Ficoll hypaque* 1119, (f) *Buffy coat* eritrosit



Pemberian perlakuan protein antioksidan, antigen fMLP, dan NBT



Inkubasi dalam inkubator shaker

Lampiran N. Foto Penelitian Pendahuluan Produksi Radikal Superoksida Neutrofil



Produksi radikal superoksida neutrofil yang dipapar antigen FMLP dilihat secara visual pada *well plate*.

Catatan:

- A : produksi radikal superoksida neutrofil yang dipapar antigen FMLP inkubasi selama 1 jam, medium tampak berwarna bening.
- B : produksi radikal superoksida neutrofil yang dipapar antigen FMLP inkubasi selama 2 jam, medium tampak berwarna bening agak keruh.
- C : produksi radikal superoksida neutrofil yang dipapar antigen FMLP inkubasi selama 3 jam, medium tampak berwarna bening agak keruh.
- K : neutrofil tanpa paparan antigen FMLP dan protein antioksidan
- K- : neutrofil dipapar antigen FMLP tanpa paparan protein antioksidan
- K+ : neutrofil dipapar antigen FMLP dan protein GSH
- P : neutrofil dipapar antigen FMLP dan protein Gg-PH