



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

SKRIPSI

Oleh
Izza Khalida
NIM 121610101078

Pembimbing

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

Penguji

Dosen Penguji Ketua : drg. Zahara Meilawaty, M.Kes
Dosen Penguji Anggota : drg. Izzata Barid, M.Kes

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



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

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S 1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh
Izza Khalida
NIM 121610101078

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
2. Ibu Ir. Hj. Ida Haidaroh dan Ayah Drs. H. Muhammad Nafi'.
3. Dosen pembimbing utama, dosen pembimbing akademik sekaligus ketua proyek BOPTN Kementrian ristek dan Dikti yang telah mendanai sebagian penelitian ini, Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes dan Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P, M.Agr., Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang sudah memberikan pengalaman dan wawasan baru berkaitan dengan penelitian dan skripsi saya.
4. Seluruh guru saya sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi.

MOTTO

“... Sampaikanlah kabar gembira kepada malam hari bahwa sang fajar pasti datang mengusirnya dari puncak-puncak gunung dan dasar-dasar lembah. Kabarkan juga kepada orang yang sedang dilanda kesusahan bahwa, pertolongan akan datang secepat kelebatan cahaya dan kedipan mata...”¹

¹ Al-Qarni, 'Aidh. 2004. *La Tahzan, jangan bersedih*. Jakarta: Qisthi Press.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Izza Khalida

NIM : 121610101078

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Monosit In Vitro” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 28 Maret 2016

Yang menyatakan,

Izza Khalida

NIM 1216101078

SKRIPSI

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

Oleh

Izza Khalida
NIM 121610101078

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

Karya ilmiah skripsi berjudul “Aktivitas Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Monosit In Vitro” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Senin, 28 Maret 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji:

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes

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

NIP. 196109031986022001

NIP. 197008101998031001

Penguji Ketua

Penguji Anggota

drg. Zahara Meilawaty, M.Kes

drg. Izzata Barid, M.Kes

NIP. 198005272008122002

NIP. 196805171997022001

Mengesahkan

Dekan,

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

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Monosit *In Vitro*; Izza Khalida, 121610101078; 2016; 44 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Monosit dan makrofag mampu memproduksi radikal superoksida sebagai agen *signaling* dan antibakteri. Produksi radikal superoksida yang berlebih menyebabkan stres oksidatif yang berujung pada berbagai penyakit. Efek kerusakan ini akan berhenti apabila radikal bebas bereaksi dengan antioksidan. Salah satu potensi sumber antioksidan alami yang sudah banyak diteliti adalah biji melinjo. Kandungan flavonoid ekstrak biji melinjo menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas, fraksi isolat protein biji melinjo mampu memperlambat proses oksidasi, fraksi protein biji melinjo terhidrolisis menunjukkan aktivitas yang mirip glutathione (GSH) dan BHT, mampu meredam radikal hidroksil dan hidrogen peroksida serta memiliki kemampuan proteksi DNA. Namun demikian, belum diketahui bagaimana aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis terhadap radikal superoksida yang dihasilkan oleh monosit. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa monosit tidak terlihat menghasilkan radikal superoksida ekstraseluler pada inkubasi 1 jam, sehingga juga dilakukan pengamatan pada inkubasi 18 jam. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis dalam menghambat produksi superoksida monosit *in vitro* dan mengkaji perbedaan aktivitas antioksidan biji melinjo terhidrolisis terhadap radikal superoksida monosit pada perlakuan waktu inkubasi 1 jam dan 18 jam.

Penelitian dilakukan pada bulan November 2015 – Januari 2016 di *Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)* dan Laboratorium *Bioscience* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dengan dua tahap penelitian

aitu uji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) dan uji aktivitas antioksidan Gg-PH pada monosit. Uji aktivitas antioksidan Gg-PH dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan Gg-PH sebelum dipaparkan pada monosit. Uji aktivitas antioksidan Gg-PH pada isolat monosit dilakukan dengan memaparkan Gg-PH (30 µg) pada monosit kemudian diuji dengan *Nitroblue Tetrazolium* (NBT). Produksi radikal superoksida monosit setelah perlakuan Gg-PH diamati dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol. Produksi radikal superoksida monosit intrasel dianalisa dengan mikroskop sedangkan produksi radikal superoksida ekstrasel dianalisa dengan spektrofotometer. Pengamatan dilakukan pada kelompok monosit yang diinkubasi selama 1 jam dan kelompok monosit inkubasi 18 jam. Hasilnya, produksi radikal superoksida ekstrasel tidak ada beda nyata. Produksi radikal bebas intrasel pada kelompok Gg-PH inkubasi 1 jam lebih sedikit dibandingkan kelompok yang hanya diberi *N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine* (fMLP) secara nyata. Sedangkan produksi radikal superoksida masing-masing kelompok inkubasi 18 jam lebih banyak secara nyata dibanding kelompok inkubasi 1 jam.

Pengamatan pada inkubasi monosit selama 1 jam Gg-PH mampu meredam terbantuknya radikal bebas, namun pada inkubasi 18 jam menunjukkan bahwa antioksidan Gg-PH tidak mampu menetralkan radikal superoksida monosit. Hal ini mengindikasikan pemberian antioksidan untuk menetralkan radikal bebas dalam tubuh harus berulang. Pengembangan Gg-PH sebagai suplemen antioksidan nantinya harus mempertimbangkan durasi serta dosis, barrier enzim yang membatasi absorpsi protein dari traktus gastrointestinal, aktivitas biologis protein antioksidan Gg-PH saat memasuki sirkulasi darah, reaksi saat melintasi membran sel serta kemungkinan alergi harus diwaspadai dalam upaya berkelanjutan dalam mengembangkan sumber antioksidan baru untuk meningkatkan taraf kesehatan manusia. Perlu diteliti lebih lanjut mengenai jenis protein antioksidan biji melinjo terhidrolisis yang paling efektif untuk meredam radikal superoksida dan memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Monosit In Vitro”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost; selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
2. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes; selaku Dosen Pembimbing Utama, Dosen Pembimbing Akademik sekaligus ketua proyek penelitian BOPTN Kementerian Ristek dan Dikti yang telah bersedia meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan skripsi ini, juga telah memberi saya kesempatan untuk ikut serta dalam proyek penelitian yang membuka wawasan saya lebih luas lagi.
3. Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Agr., Ph.D; selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberi banyak wawasan dan pengalaman baru selama penelitian ini.
4. Ibu Ir. Hj. Ida Haidaroh dan Ayah Drs. Muhammad Nafi; kedua orang tua yang tak pernah putus mendoakan, memperjuangkan, menyemangati, menyayangi dan mendidik saya agar bisa menjadi pribadi yang lebih baik.
5. Dr.Alfian Futuhul Hadi, S.Si., M.Si dan Halimatus Sa'diyah, S.Si, M.Si; Paklik dan Bulik saya yang sudah seperti orang tua kedua saya selama saya berkuliah di kota Jember.

6. Ayu Prativia Yonenda, Miftah Dewi Masyitoh, Anggita dan Meidi Kurnia Ariani; sahabat-sahabat terdekat saya yang tak putusny saling menyemangati dan selalu menemani dalam susah maupun senang.
7. Adik saya Mutia Ananda, sepupu Aida Safitri serta sepupu seperjuangan Ahmad Syahrian Noer. Terimakasih atas semangat dan bantuannya selama ini.
8. Teman seperjuangan satu penelitian SKRIPSI HORE; Via, Gung Is, Vinanti, Tria, Dewi, Nervi, Junti, Wulan dan Amel. Terimakasih kerjasama, semangat dan bantuannya.
9. Teman satu penelitian MELINJO; A Agung Istri P, Zahrina Amalia, Ivan Kristantya, terimakasih bimbingan dan kerjasamanya selama di CDAST.
10. Mas Lilik, Mbak NH, Mbak Frida, Mas Aryo, Mbak Wardah, Mbak Fitri, Mbak Zul, senior dan teman-teman lain di Lab.CDAST yang tidak bisa disebutkan satu persatu.
11. Mbak Azizah dan Mas Erwan yang sudah banyak membantu di Lab. Bioscience FKG Universitas Jember. Juga Mbak Indri dan Mbak Wahyu terima kasih bantuannya selama di Lab. Mikro dan Histologi FKG.
12. Sahabat kesayangan sejak bangku SMA; Robbi, Zuh dan Yusuf.
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Maret 2016

Penulis

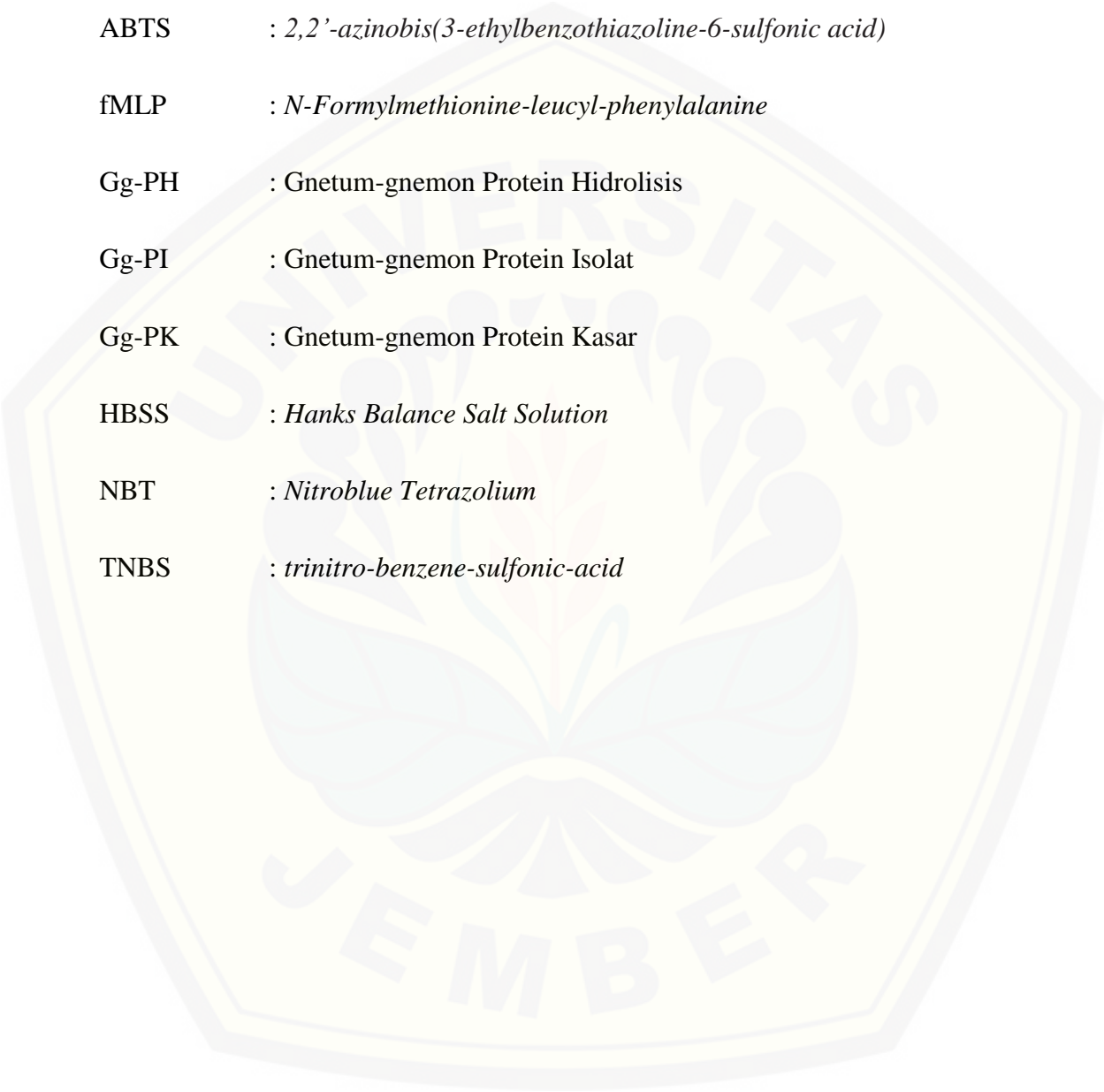
DAFTAR ISI

HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
HALAMAN 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	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Radikal bebas.....	4
2.1.1 <i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>	4

2.1.2	Kerusakan Akibat ROS.....	6
2.2	Monosit.....	7
2.2.1	Peran dan Fungsi Monosit dalam Sistem Imun Non Spesifik	8
2.3	Antioksidan.....	10
2.3.1	Glutathione (GSH).....	11
2.3.2	<i>Phytonutrients</i>	11
2.4	Melinjo (<i>Gnetum gnemon Linn</i>)	12
2.5	Protein sebagai Antioksidan.....	14
2.6	Kerangka Konsep.....	16
2.7	Hipotesis Penelitian	17
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	18
3.1	Jenis dan Rancangan Penelitian	18
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.3	Variabel.....	18
3.3.1	Variabel Bebas	18
3.3.2	Variabel Terikat	19
3.3.3	Variabel Terkendali.....	19
3.4	Definisi Operasional.....	19
3.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	19
3.5.1	Alat Penelitian.....	19
3.5.2	Bahan Penelitian	20
3.6	Prosedur Penelitian	21
3.6.1	Uji Aktivitas Antioksidan Gg-PH.....	21

3.6.2	Uji Aktivitas Antioksidan Gg-PH pada Monosit	25
3.7	Analisis Data	31
3.8	Alur Penelitian.....	32
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		33
4.1	Hasil.....	33
4.1.1	Hasil Uji Antioksidan Gg-PH	33
4.1.2	Hasil Uji Antioksidan Gg-PH pada Monosit	33
4.1.3	Analisis Data.....	37
4.2	Pembahasan	40
BAB 5. PENUTUP		43
5.1	KESIMPULAN.....	43
5.2	SARAN	43
DAFTAR PUSTAKA.....		44
LAMPIRAN.....		48

DAFTAR SINGKATAN



ABTS	: <i>2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)</i>
fMLP	: <i>N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine</i>
Gg-PH	: Gnetum-gnemon Protein Hidrolisis
Gg-PI	: Gnetum-gnemon Protein Isolat
Gg-PK	: Gnetum-gnemon Protein Kasar
HBSS	: <i>Hanks Balance Salt Solution</i>
NBT	: <i>Nitroblue Tetrazolium</i>
TNBS	: <i>trinitro-benzene-sulfonic-acid</i>

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kandungan gizi biji melinjo.....	13
4.1 Hasil hidrolisis protein biji melinjo dan hasil uji antioksidan Gg-PH	33
4.2 Hasil uji HSD produksi radikal superoksida intra seluler antar kelompok	39

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Monosit pewarnaan Wright's dan pengamatan dengan minyak emersi (Sumber: Eroschenko dan Fiore, 2008)	7
2.2 Biji melinjo (Sumber: http://www.melinjo.net/ diakses 9 Mei 2015, 11:04	13
2.3 Kerangka konsep penelitian	16
3.1 Prosedur penelitian uji aktivitas antioksidan Gg-PH	21
3.2 Kelompok penelitian uji aktivitas Gg-PH pada monosit metode NBT.....	27
3.3 Gambar hasil sentrifugasi isolasi monosit dari darah vena perifer	28
3.4 Alur penelitian	32
4.1 Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida setelah dipapar protein biji melinjo (Gg-PH) dan diuji NBT, perbesaran 1000x.	35
4.2 Rata-rata jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida intra seluler per seratus sel (Uji NBT).	36
4.3 Produksi radikal superoksida ekstra seluler monosit (uji NBT dan pengamatan spektrofotometri).....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penghitungan Jumlah Sampel.....	48
B. Surat Ijin Penelitian.....	49
C. Surat Persetujuan subyek penelitian dan <i>ethical approva</i>	51
D. Penghitungan konsentrasi protein dan derajat hidrolisis	54
E. Hasil uji ABTS dan uji pirogalol	56
F. Gambaran mikroskopik hasil isolasi monosit darah vena perifer pengecatan giemsa	57
G. Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida	58
H. Penghitungan monosit yang memproduksi radikal superoksida inkubasi 1 jam dan 18 jam	70
I. Hasil absorbansi radikal superoksida ekstra seluler 1 jam dan 18 jam.....	72
J. Penghitungan uji lanjutan HSD	76
K. Alat dan Bahan.....	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Monosit dan makrofag adalah sel fagositik yang berperan dalam sistem imun nonspesifik tubuh terhadap benda asing dan jejas. Keduanya memiliki kemampuan untuk memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) contohnya radikal superoksida. Produksi radikal superoksida monosit berfungsi untuk *signaling* dan sebagai agen antibakteri pada aktivitas fagositik (Wintrobe, 2014). Monosit dan makrofag adalah sumber radikal bebas endogen (Halliwell, 2005).

Radikal superoksida juga diproduksi dari reaksi redoks pada semua sel (Wintrobe, 2014; Kumar, *et al.*, 2015). Radikal superoksida memiliki kecenderungan bereaksi dengan molekul lain didekatnya. Radikal superoksida akan mengambil elektron dari molekul didekatnya agar mencapai kestabilan kimia, sedangkan molekul yang kehilangan elektron akan menjadi radikal bebas baru sehingga terjadilah rantai reaksi radikal bebas atau *chain reaction* (Halliwell, 2005; Mehta *et al.*, 2009).

Tubuh memiliki berbagai mekanisme pertahanan untuk menetralkan radikal bebas endogen. Mekanisme ini berfungsi untuk mencegah kerusakan komponen seluler akibat reaksi rantai radikal bebas. Diantaranya berupa sistem enzim superoksida dismutase (SOD), glutathione (GSH), katalase dan antioksidan (Kumar *et al.*, 2015). Namun, apabila mekanisme pertahanan sel tidak mampu menetralkan radikal bebas endogen maka akan timbul stres oksidatif.

Stres oksidatif menyebabkan kerusakan komponen selular seperti lemak, protein dan DNA. Stres oksidatif akibat *chain reaction* memicu nekrosis sel yang menginduksi kerusakan jaringan disekitarnya (Kumar, *et al.*, 2015). Kerusakan ini dapat menyerang berbagai macam jaringan dan organ sehingga menyebabkan perubahan struktur dan fungsi sel yang berujung pada berbagai penyakit seperti kanker,

aterosklerosis, periodontitis dan penyakit inflamasi kronis lainnya (Guyton dan Hall, 2006; Birben et al., 2012).

Efek kerusakan ini akan berhenti apabila radikal bebas bereaksi dengan antioksidan. Antioksidan adalah sebuah substansi yang mampu menghambat oksidasi meski dalam konsentrasi kecil (Halliwell, 2008). Antioksidan ini bekerja dengan menyumbangkan satu elektron kepada radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi stabil dan menjadi tidak reaktif. Selain itu antioksidan mampu menginaktivasi ROS, meredam radikal bebas, dan meredam pengikatan ion metal transisi.

Antioksidan diharapkan mampu mencegah berbagai penyakit akibat radikal bebas. Salah satu potensi sumber antioksidan alami yang sudah banyak diteliti adalah biji melinjo. Kandungan flavonoid ekstrak biji melinjo menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas, antimikroba, inhibitor lipase dan α -amilase. Selain itu dilaporkan juga bahwa ekstrak biji melinjo mampu menurunkan glukosa, menginduksi apoptosis sel kanker usus besar, memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri (Kato *et al.*, 2009).

Penelitian Siswoyo (2007) diketahui bahwa terdapat dua fraksi protein isolat biji melinjo dengan berat molekul sekitar 12 kD dan 30 kD terbukti mampu memperlambat proses oksidasi, jangka waktu terjadinya oksidasi bisa diperlambat maka kerusakan komponen seluler dapat ditekan. Protein isolat tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan mirip Butil Hidroksil Toluene (BHT). Hasil uji peredaman radikal bebas DPPH, ABTS, radikal superoksida oleh fraksi protein biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase juga menunjukkan aktivitas yang mirip dengan glutathione (GSH) dan Butil Hidroksil Toluene (BHT) (Siswoyo, *et al.*, 2011). Selain itu fraksi protein biji melinjo terhidrolisis menunjukkan kemampuan peredaman radikal hidroksil, hidrogen peroksida serta memiliki kemampuan proteksi DNA (Nurfadillah, 2016). Sejauh ini belum diketahui bagaimana efek antioksidan protein biji melinjo terhadap sel manusia. Demikian pula tentang aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis terhadap radikal superoksida yang dihasilkan oleh monosit. Penelitian ini

merupakan penelitian pertama yang mencobakan antioksidan biji melinjo terhadap sel manusia. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa monosit tidak terlihat menghasilkan radikal superoksida ekstraseluler pada inkubasi 1 jam, sehingga juga dilakukan pengamatan pada inkubasi 18 jam.

1.2 Rumusan Masalah

Belum ada penelitian tentang uji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis yang dicobakan pada radikal superoksida monosit manusia, maka permasalahan yang dapat dirumuskan sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan biji melinjo terhidrolisis terhadap radikal superoksida monosit?
2. Apakah ada perbedaan aktivitas antioksidan biji melinjo terhidrolisis terhadap radikal superoksida monosit yang diinkubasi selama 1 jam dan 18 jam?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis dalam menghambat produksi superoksida monosit *in vitro* dan mengkaji perbedaan aktivitas antioksidan biji melinjo terhidrolisis terhadap radikal superoksida monosit pada perlakuan waktu inkubasi 1 jam dan 18 jam.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Meningkatkan pemahaman tentang aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis.
2. Memberikan sumbangan pemikiran bagi ilmu pengetahuan kedokteran dasar tentang manfaat biji melinjo sebagai antioksidan untuk mencegah berbagai penyakit.
3. Sebagai dasar untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal bebas

Menurut Halliwell (2005), radikal bebas adalah senyawa memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluar yang membuat radikal bebas menjadi sangat reaktif terhadap senyawa atau molekul lain. Radikal bebas akan mengambil elektron dari senyawa atau molekul tersebut untuk mencapai kestabilan kimia sedangkan senyawa atau molekul lain yang kehilangan satu elektron akan rusak dan menjadi radikal bebas baru. Peristiwa pembentukan radikal baru secara berkelanjutan ini disebut rantai reaksi radikal bebas atau *chain reaction*. Pada akhirnya rantai reaksi ini merusak makromolekul seperti protein, lemak, bahkan DNA sel dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif (Leong dan Shui, 2001; Arief, 2006).

Radikal bebas dapat bersumber dari luar maupun dalam tubuh. Sumber radikal bebas dari luar tubuh atau sumber radikal bebas eksogen diantaranya obat-obatan, radiasi sinar X, radiasi sinar gamma, asap rokok, ozon, dan lain sebagainya (Mehta, 2009). Sumber radikal bebas yang berasal dari dalam tubuh atau endogen contohnya reaksi redoks dan autooksidasi, oksidasi enzimatik, *respiratory burst*, dan organel subselular. Produksi radikal bebas endogen akan meningkat pada saat metabolisme enzim dan zat kimia eksogen dan saat terjadi inflamasi dimana radikal bebas dihasilkan oleh leukosit (Kumar, *et al.*, 2015).

2.1.1 *Reactive Oxygen Species* (ROS)

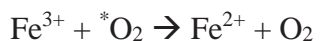
Salah satu jenis radikal bebas adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau spesies oksigen reaktif. ROS adalah radikal bebas yang berasal dari oksigen (Kumar, *et al.*, 2015). ROS terdiri atas beberapa senyawa nonradikal derivat oksigen, seperti

hidrogen peroksida, oksigen tunggal, dan asam hipoklorit. ROS tersebut, terutama radikal superoksida secara konstan diproduksi oleh tubuh (Halliwell, 2005).

Radikal superoksida adalah radikal bebas yang paling banyak diproduksi di dalam tubuh. Radikal superoksida berasal dari reduksi satu elektron bebas tak berpasangan pada lapisan kulit terluar oksigen (Birben, *et al.*, 2012). Radikal ini diproduksi oleh sel fagositik dan berfungsi untuk membunuh bakteri. Selain terjadi pembentukan radikal superoksida di dalam sel makrofag dan neutrofil, produksi pada ekstrasel juga terjadi dalam jumlah sedikit sebagai molekul sinyal interseluler oleh beberapa tipe sel lain seperti sel endotel, limfosit dan fibroblast (Halliwell, 2005).

Produksi radikal superoksida dimediasi enzim nikotin adenine dinukleotida fosfat (NADPH) oksidase, xantin oksidase, sistem transpor elektron (STE) mitokondria, autooksidasi hidroquinon dan katekolamin, sel fagosit, interaksi oksigen dan hemoglobin dan radiasi ion (Mehta *et al.*, 2009). NADPH oksidase ditemukan pada polimorfonuklear leukosit, monosit dan makrofag selama fagositosis. NADPH oksidase memediasi pembentukan superoksida lewat *respiratory burst* yang mengawali aktivitas bakterisidal dan denaturasi protein antigen (Percival, 1998; Birben *et al.*, 2012).

Radikal superoksida dikonversi menjadi hidrogen peroksida oleh enzim superoksida dismutase. Hidrogen peroksida mudah sekali berdifusi ke membran plasma. Hidrogen peroksida diproduksi oleh xantine oksidase, amino oksidase dan NADPH oksidase. Hidrogen peroksida juga diproduksi dalam peroksisom oleh konsumsi oksigen selama reaksi metabolik. Dalam reaksi Haber-Weins dan Fenton, hidrogen peroksida dapat memecah radikal hidroksil dalam transmisi logam seperti Fe^{2+} atau Cu^{2+} .



Haber - Weiss



Reaksi Fenton

Radikal superoksida dapat bereaksi dengan hidrogen peroksida dan menghasilkan radikal hidroksil. Radikal hidroksil adalah ROS yang paling reaktif yang dapat merusak protein, lemak, karbohidrat dan DNA (Birben *et al.*, 2012).

2.1.2 Kerusakan Akibat ROS

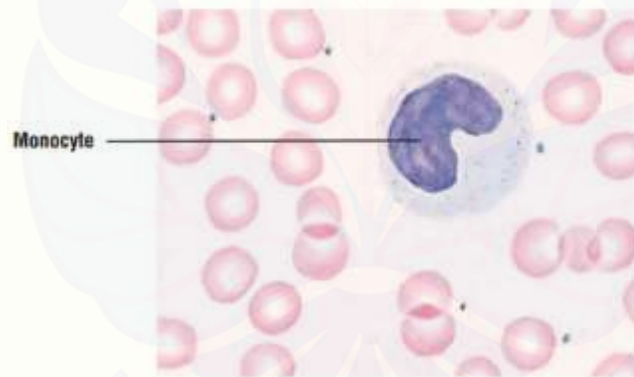
Telah dijelaskan sebelumnya bahwa produksi ROS dalam jumlah kecil dalam tubuh dijumpai pada jalur sinyal sel dan reaksi fisiologis tubuh. ROS diproduksi dalam keadaan normal dan regulasi intrasel telah diatur ketat untuk menghindari efek radikal bebas yang merugikan. Namun, produksi ROS yang berlebihan mengakibatkan kerusakan komponen seluler seperti protein, lemak dan DNA. Kerusakan yang mampu ditimbulkan oleh ROS dapat melalui 3 reaksi utama berupa peroksidasi lemak membran, reaksi silang dan perubahan lain pada protein serta kerusakan DNA (Kumar, *et al.*, 2015).

Peroksidasi lemak terjadi karena ikatan rangkap pada membran lemak *unsaturated* bereaksi dengan ROS menghasilkan peroksidase yang tidak stabil dan reaktif sehingga terjadi rantai reaksi autokatalitik. Hal ini menyebabkan lenyapnya fosfolipid dan menyebabkan defek pada permeabilitas membran sehingga permeabilitas membran meningkat. Defek akibat peroksidasi lemak dapat terjadi pada membran mitokondria, membran plasma dan membran lisosom yang dapat berujung pada nekrosis sel (Kumar, *et al.*, 2015).

Kerusakan protein dan DNA yang terakumulasi menyebabkan apoptosis sel pada kondisi patologis. Tubuh akan mengeliminasi sel yang telah mengalami gangguan genetik atau kerusakan yang tidak dapat diperbaiki dengan cara mengaktifkan apoptosis sel. Kerusakan DNA, akumulasi protein yang salah bentuk, dan jejas sel pada beberapa infeksi yang memicu apoptosis jalur mitokondria intrinsik. Kemudian sel apoptosis akan dibersihkan dan dicerna oleh sel fagositik (Kumar, *et al.*, 2015).

2.2 Monosit

Monosit adalah salah satu sel darah putih yang berperan pada mekanisme pertahanan tubuh pertama terhadap benda asing, berbentuk bundar dengan ukuran kurang lebih 10-15 μm , merupakan sel darah putih agranular terbesar. Inti monosit dapat berbentuk oval, bentuk ginjal, atau bertekuk seperti bentukan tapal kuda. Sitoplasma monosit seperti jala, bervakuola dengan butiran halus basofilik. Sitoplasma monosit juga mengandung enzim-enzim litik. Monosit diproduksi di sumsum tulang dari stem sel hematopoietik. Monosit beredar di pembuluh darah, selama 10 hingga 20 jam. Monosit didistribusikan hampir ke seluruh jaringan dan bermigrasi ke jaringan dengan melakukan diapedesis. Di jaringan, monosit bertambah besar dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Kemudian makrofag dapat menghancurkan bakteri, benda asing, dan debris (Leeson *et al.*, 1996; Guyton dan Hall, 2006; Eroschenko dan Fiore, 2008; Wintrobe, 2014).



Gambar 2.1 Monosit pewarnaan Wright's dan pengamatan dengan minyak emersi (Sumber: Eroschenko dan Fiore, 2008)

Monosit memegang peranan penting dalam sistem imun non spesifik. Monosit memiliki kemampuan kemotaksis ke jaringan inflamasi, migrasi dari pembuluh darah ke jaringan dan mampu menempel pada sel lain dengan menggunakan reseptor adesi spesifik pada permukaannya. Beberapa fungsi monosit yang sudah diketahui yaitu mengenali antigen, marker, sensor dan regulator membran plasma; mengenali sitosol dan sebagai aktivasi inflamasi; berperan pada endositosis dan fagositosis;

berperan pada *signaling* dan ekspresi gen; sebagai *antigen presentation*; sebagai sel sekresi enzim dan bahan kimia lain; memiliki fungsi antimikroba serta berperan dalam inflamasi dan repair jaringan (Abbas, *et al.*, 2012; Wintrobe, 2014).

2.2.1 Peran dan Fungsi Monosit dalam Sistem Imun Non Spesifik

Sistem imun non spesifik atau sistem imun alami adalah pertahanan tubuh pertama terhadap jejas yang terdiri atas mekanisme seluler dan biokimia. Sistem imun non spesifik bekerja merespon jejas dengan cara yang sama tiap kali jejas tersebut terjadi. Pada prinsipnya, sistem imun non spesifik bekerja dengan mekanisme barrier kimia dan epitelial, mekanisme sel fagositik termasuk monosit, protein darah seperti sistem komplemen dan mediator kimia, sitokin untuk meregulasi sistem imun spesifik (Abbas, *et al.*, 2012).

Jika mikroba infeksius berhasil menerobos pertahanan subepitel, monosit akan menghasilkan sitokin TNF (*tumor necrosis factor*) dan IL-1 (interleukin 1). TNF dan IL-1 menginduksi endotel memproduksi molekul adhesi berupa *E-selectin* dan *P-selectin*. Monosit memiliki karbohidrat dipermukaan tubuhnya yang akan berikatan secara lemah dengan molekul adhesi tersebut sehingga monosit dapat bergulir dipermukaan endotel. Selanjutnya sel endotel akan merespon TNF dan IL-1 dengan memproduksi kemokin. Kemokin kemudian berikatan dengan endotel dan bereaksi dengan integrin sehingga afinitasnya meningkat serta menginduksi peningkatan produksi integrin. Setelah itu integrin akan berikatan erat dengan ligannya, monosit berhenti *rolling* dan menempel pada endotel. Monosit keluar melalui sela-sela endotel ke jaringan. Di jaringan, monosit berdiferensiasi menjadi makrofag jaringan (Akib, *et al.*, 2008).

Lewat reseptor spesifik pada produk mikroba, makrofag mampu mengenali mikroba. Contoh reseptor pengenal mikroba adalah reseptor pengenal peptida *N-formylmethionine*, reseptor manosa, integrin (Mac-1) dan *scavenger*. Reseptor sel fagosit berikatan dengan mikroba kemudian makrofag melebarkan membran plasma

sehingga dapat melingkari mikroba. Setelah itu terbentuklah vesikel dengan dinding berupa membran plasma yang disebut fagosom. Fagosom akan bergabung dengan lisosom dan menjadi fagolisosom. Selanjutnya makrofag akan melakukan mekanisme mikrobisidal pada fagolisosom dengan menggunakan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan enzim proteolitik (Akib, *et al.*, 2008; Abbas, *et al.*, 2012).

Reseptor permukaan fagosit akan mengaktifasi enzim di dalam fagolisosom. Enzim yang teraktivasi adalah enzim fagosit oksidase, enzim iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) dan enzim protease lisosom. Enzim fagosit oksidase bertugas mengubah oksigen menjadi radikal superoksida dan radikal bebas lainnya yang toksik bagi mikroba, enzim iNOS bertugas untuk mengkatalisator perubahan arginin menjadi oksida nitrit, sedangkan enzim protease lisosom berfungsi untuk memecah protein mikroba (Akib, *et al.*, 2008)

Enzim fagosit oksidase adalah multisubunit enzim paling utama yang berperan pada aktivasi makrofag dan mampu mengkonversi oksigen menjadi ROS yaitu agen oksidasi yang sangat reaktif dan bersifat sangat merusak terhadap mikroba dan sel lain. Fagosit oksidase diaktivasi oleh berbagai stimuli diantaranya IFN- γ dan sinyal TLRs. Fungsi enzim ini adalah mereduksi molekul oksigen menjadi ROS seperti radikal superoksida dengan *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) sebagai kofaktor (Abbas, *et al.*, 2012; Kumar, *et al.*, 2015).

Radikal superoksida akan dikonversi menjadi hidrogen peroksida secara enzimatik dengan enzim superoksida dismutase (SOD). Hidrogen peroksida dikonversi menjadi hidroksil radikal oleh enzim mieloperoksidase. Proses produksi ROS ini disebut *respiratory burst* karena terjadi pada saat konsumsi oksigen pada respirasi seluler (Abbas, *et al.*, 2012).

Makrofag yang teraktivasi memproduksi beberapa enzim proteolitik dalam fagolisosom yang berfungsi menghancurkan mikroba. Enzim-enzim tersebut tidak merusak sel fagosit (Akib, *et al.*, 2008). Namun, ketika neutrofil dan makrofag teraktivasi secara berlebihan, keduanya mampu menyebabkan kerusakan jaringan tubuh

oleh karena pelepasan enzim lisosom, ROS dan oksida nitrit. Apabila produk-produk tersebut mencapai ekstraseluler, produk tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Abbas, *et al.*, 2012).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah sebuah substansi yang ketika terdapat pada konsentrasi kecil disbanding dengan substrat yang mudah teroksidasi mampu menghambat oksidasi substrat tersebut (Halliwell, *et al.*, 2005). Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan mampu mengikat radikal bebas sehingga oksidasi bisa dihambat. (Winarsi, 2005).

Antioksidan adalah zat yang dapat melawan radikal bebas yang terbentuk dari hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh. Antioksidan memiliki fungsi untuk menghentikan atau memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh, sehingga dapat menyelamatkan sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas. Antioksidan menetralkan radikal bebas dengan cara memberikan satu elektronnya kepada radikal bebas, sehingga menjadi non radikal (Rohmatussolihat, 2009).

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi 2 yaitu antioksidan enzimatis dan nonenzimatis. Antioksidan enzimatis contohnya enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathione (GSH). Antioksidan non-enzimatis terbagi menjadi 2 kelompok lagi yaitu antioksidan larut lemak seperti – tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon dan bilirubin serta antioksidan larut air seperti asam askorbat (vitamin c), asam urat, protein pengikat logam dan protein pengikat heme (Winarsi, 2005).

Sistem enzim tersebut berfungsi menetralkan radikal bebas sehingga mampu mengurangi kerusakan sel. SOD bertugas mengkonversi radikal superoksida menjadi

hidrogen peroksida. GSH adalah komponen mayor dari pertahanan selular mamalia melawan injuri (Hardwick *et al.*, 1999). GSH mampu menetralkan berbagai macam ROS diantaranya radikal hidroksil, radikal superoksida dan hidrogen peroksida (Percival, 1998).

2.3.1 Glutathione (GSH)

Glutathione adalah antioksidan larut air yang penting bagi tubuh, disintesis dari asam amino glisin, glutamate dan sistein. Glutathione secara langsung menetralkan ROS pada lipid peroksidase dan berperan pada metabolisme xenobiotik (Percival, 1998). Gugus thiol pada GSH merupakan agen reduksi yang poten terdapat pada intra seluler, konsentrasinya mencapai milimolar pada beberapa jaringan. Sebagai antioksidan yang penting bagi tubuh, GSH berperan dalam detoksifikasi berbagai ikatan elektrofilik dan peroksidase dengan jalur *glutathione S-transferases* (GST) dan *glutathione peroxidase* (GPx) (Townsend, *et al.*, 2003).

Glutathione merupakan kelompok enzim utama sebagai pelindung sel dari kerusakan oksidatif yang banyak dijumpai di sitoplasma semua sel sedangkan katalase banyak dijumpai pada peroksisom. Glutathione dan katalase bertugas melakukan katabolisme hidrogen peroksida hasil konversi radikal superoksida oleh SOD (Poli, 2011; Abbas, *et al.*, 2012; Kumar, *et al.*, 2015).

Glutathione peroksidase (GPx) bersama dengan katalase dan SOD berfungsi sebagai agen proteksi sel dari ROS. Glutathione peroksidase melakukan detoksifikasi peroksida dengan berfungsi sebagai *donor electron* pada reaksi reduksi menghasilkan oksidasi GSH atau GSSG. GSSH direduksi menjadi GSH oleh GSH reduktase (GR) dan NADPH (Townsend, *et al.*, 2003; Halliwell, *et al.*, 2005).

2.3.2 *Phytonutrients*

Aktivitas antioksidan yang sudah banyak diteliti didapatkan dari substansi turunan dari berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang disebut *phytonutrients* atau

phytochemical. Kandungan fenolik seperti flavonoid banyak ditemukan pada tumbuhan. Pada tumbuhan, flavonoid berfungsi sebagai protektor terhadap berbagai macam stres, sedangkan pada manusia, flavonoid berfungsi sebagai *biological response modifier* (Percival, 1998).

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa flavonoid memiliki fungsi antiinflamasi, antialergi, antivirus, antiaging, dan antikariogenik. Efek terapinya mampu melengkapi aktivitas antioksidan flavonoid. Aktivitas antioksidan flavonoid mampu berperan sebagai proteksi terhadap penyakit jantung karena bisa menghambat siklooksigenase dan lipooksigenase platelet dan makrofag. Jalan terbaik untuk mendapatkan keuntungan diet *phytonutrients* adalah dengan konsumsi berbagai macam buah dan sayuran segar (Percival, 1998).

2.4 Melinjo (*Gnetum gnemon* Linn)

Melinjo (*Gnetum gnemon*, Linn) adalah tumbuhan biji terbuka atau gymnospermae yang bijinya tidak terbungkus daging buah, biji melinjo hanya terbungkus kulit luar. Tumbuhan melinjo dapat hidup di daerah kering maupun lembab. Tumbuhan ini juga dengan mudah ditemui di Malaysia dan Indonesia. Daun melinjo sering diolah menjadi masakan, sedangkan bijinya biasa diolah menjadi kudapan (Sunanto, 1991; Lim, 2012).

Biji melinjo terbungkus 3 selaput, selaput pertama adalah kulit luar biasanya berwarna hijau saat muda, kemudian perlahan berubah menjadi kuning, jingga dan merah. Buah melinjo yang telah matang fisiologis berwarna merah berbentuk ovoid dengan panjang kurang lebih 1-3,5 cm. Di bawah kulit luar terdapat kulit biji yang keras, di bawah kulit biji yang keras terdapat kulit ari (Allen, 1967; Rahardja, 1982; Manner dan Elevitch, 2006).



Gambar 2.3 Biji melinjo (Sumber: <http://www.melinjo.net/> diakses 9 Mei 2015, 11:04)

Biji melinjo memiliki potensi sebagai antioksidan alami dengan bioavailabilitas tinggi. Ekstrak biji melinjo menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas, inhibitor lipase dan α -amilase, dan antimikroba. Selain itu oligomer stilbenoid yang didapat dari ekstrak melinjo yang dikeringkan diketahui mampu menurunkan glukosa, menginduksi apoptosis sel kanker usus besar, memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri (Kato *et al.*, 2009).

Diketahui dari Tabel 2.1 bahwa biji melinjo memiliki kandungan protein yang cukup tinggi yaitu 5 gram atau setara 9-11%. Biji melinjo memiliki potensi untuk menjadi sumber protein fungsional dengan bioavailabilitas tinggi. Menurut Siswoyo (2007), terdapat dua fraksi isolat protein biji melinjo yaitu protein dengan berat molekul 12 kDa dan 30 kDa. Keduanya menunjukkan kemampuan antioksidan setara dengan BHT (*Butil Hidroksi Toluena*) pada uji hambat autooksidasi asam linoleat.

Tabel 2.1 Kandungan gizi biji melinjo

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

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI tahun 1996

Peningkatan aktivitas antioksidan isolat protein biji melinjo dapat dilakukan dengan hidrolisis protein. Hidrolisis protein adalah proses terputusnya ikatan peptida protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis protein menyebabkan peningkatan kelarutan protein, berkurangnya berat molekul, berkurangnya struktur sekunder, peningkatan ketahanan terhadap panas dan peningkatan afinitas molekul protein. Hidrolisis yang dilakukan pada penelitian ini adalah hidrolisis enzim, karena hidrolisis enzim dinilai tidak merusak asam amino. Sedangkan enzim yang digunakan adalah enzim alkalase (Ortiz dan Wagner, 2002; Kong *et al.*, 2007).

Fraksi protein biji melinjo terhidrolisis telah menunjukkan aktivitas antioksidan melawan radikal bebas yang signifikan. Hasil uji peredaman radikal bebas DPPH, ABTS, radikal superoksida menunjukkan aktivitas yang mirip dengan GSH dan butil hidroksil toluen (BHT). Peredaman antioksidan oleh fraksi protein biji melinjo dievaluasi dengan mengukur inhibisi dari autooksidasi pirogallol. (Siswoyo *et al.*, 2011). Fraksi 3 protein biji melinjo yang dihidrolisi dengan alkalase memiliki kemampuan peredaman terhadap radikal hidroksil dan hidrogen peroksida yang paling kuat dibandingkan dengan fraksi protein yang lain. Fraksi ini juga memiliki kemampuan proteksi DNA terhadap radikal hidroksil (Nurfadillah, 2016).

2.5 Protein sebagai Antioksidan

Protein dapat ditemukan pada seluruh organisme hidup dari bakteri, virus, hingga vertebrata dan mamalia seperti manusia. Penelitian baru-baru ini mulai memfokuskan pada penemuan potensi protein sebagai obat untuk terapi berbagai macam penyakit, karena struktur dan fungsi protein berdampak pada usaha manusia membuat suatu bahan terapi (Ratnaparkhi, *et al.*, 2011; Withford, 2013).

Protein sebagai antioksidan dapat menghambat radikal bebas melalui beberapa mekanisme. Selain itu protein memiliki potensi yang baik sebagai antioksidan tambahan dalam makanan. Protein mampu menginaktivasi ROS, meredam radikal

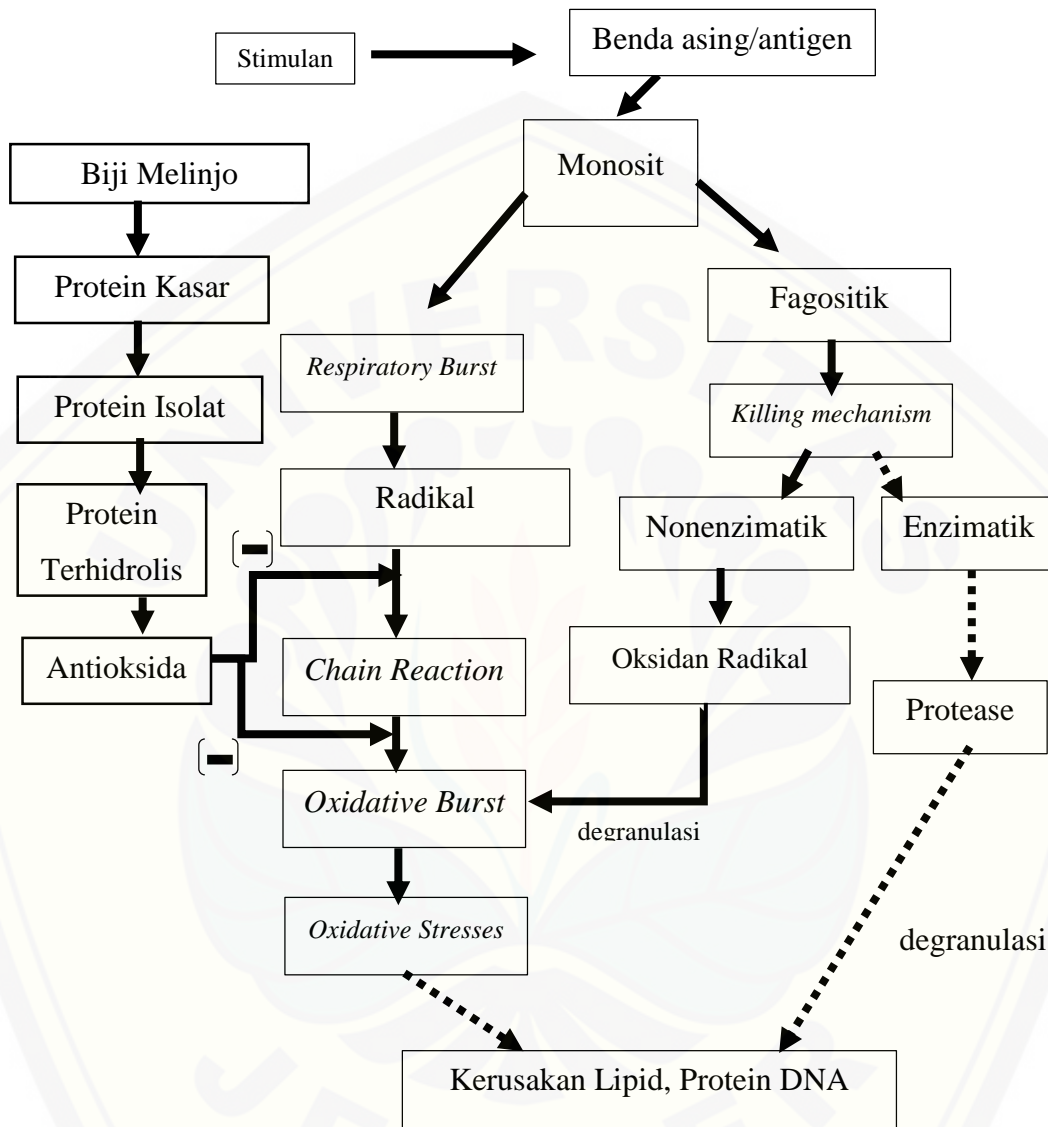
bebas, dan meredam pengikatan ion metal transisi. Tidak seperti antioksidan non-protein, protein antioksidan cenderung lebih multifungsional, tidak hanya mampu menstabilkan radikal bebas dan inisiator oksidasi namun juga mampu menjadi bioaktif antihipertensi, antimikroba, imunomodulator dan aktivitas opioid (Mine, *et al.*, 2011).

Mekanisme kerja protein sebagai antioksidan tergantung pada komposisi asam amino yang terkandung didalamnya. Meski beberapa protein menunjukkan aktivitas antioksidan, keampuhannya biasanya rendah karena banyak dari residu asam amino dan segmen peptide menghalangi struktur protein utama sehingga tidak bisa bereaksi dengan ROS. Aktivitas antioksidan dari residu asam amino terhambat oleh struktur tersier dari polipeptida (Mine, *et al.*, 2011).

Aktivitas antioksidan protein dari makanan secara umum dapat ditingkatkan aktivitasnya dengan cara hidrolisis sehingga protein akan terpotong menjadi peptida dimana peptida memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada protein. (Elias, *et al.*, 2008). Hidrolisis parsial dengan enzim alkalase dilaporkan mampu memotong rantai asam amino tersier sehingga meningkatkan kelarutan dan meningkatkan eksposur asam amino dalam protein secara efektif (Siswoyo, 2011). Peningkatan kemampuan protein terhidrolisis untuk mengurangi reaktivitas radikal bebas tergantung dari tingkat eksposur asam amino, dimana semakin tinggi tingkat eksposur maka semakin mudah peptida berikatan dengan radikal bebas (Elias, *et al.*, 2008).

Hal ini sejalan dengan mekanisme kerja antioksidan yaitu memberikan atom hidrogen secara cepat sehingga radikal bebas menjadi stabil, memotong rantai reaksi radikal bebas sehingga radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler dan melindungi sel dari kerusakan radikal bebas serta memperbaiki kerusakannya (Winarsi, 2005).

2.6 Kerangka Konsep



Gambar 2.2 Kerangka konsep penelitian

Isolat monosit diambil dari darah vena perifer orang dewasa sehat kemudian diberi stimulan berupa antigen fMLP (*N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine*) yang menginduksi *respiratory burst* dan aktivitas fagositik baik enzimatik maupun nonenzimatik. Aktivitas fagositik berupa *killing mechanism* menyebabkan monosit memproduksi oksidan radikal dan enzim protease yang menyebabkan degranulasi

lipid, protein dan DNA seluler. Sama halnya dengan fagositosis nonenzimatik, *respiratory burst* monosit juga menghasilkan produk oksidan radikal yaitu radikal superoksida. Radikal superoksida akan menyebabkan *chain reaction* yang menyebabkan *oxidative burst*. Pada akhirnya, stres oksidatif akibat *oxidative burst* akan menyebabkan kerusakan lipid, protein dan DNA. Sebagai upaya menekan produksi radikal superoksida dan memutus *chain reaction*, peneliti menggunakan protein biji melinjo terhidrolisis sebagai antioksidan.

2.7 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan dasar teori yang telah dikemukakan, hipotesis penelitian ini adalah protein biji melinjo terhidrolisis dapat mencegah produksi radikal superoksida monosit *in vitro* dan terdapat perbedaan antara aktivitas antioksidan biji melinjo terhidrolisis yang diinkubasi 1 jam dan 18 jam.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *experimental laboratories*. Obyek penelitian ini adalah isolat monosit vena perifer manusia yang diberi perlakuan protein biji melinjo terhidrolisis atau *gnetum-gnemon protein hydrolized* (Gg-PH).

Rancangan penelitian adalah *the post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan atau pengukuran produksi radikal superoksida monosit setelah perlakuan protein biji melinjo terhidrolisis dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol. Pengamatan dan pengukuran produksi radikal superoksida ini dilakukan pada kelompok monosit yang diinkubasi selama 1 jam dan kelompok monosit inkubasi 18 jam.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2015 – Januari 2016 di *Center for Development of Advanced Sciences and Technology (CDAST)* Universitas Jember dan Laboratorium *Bioscience* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

3.3 Variabel

3.3.1 Variabel Bebas

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

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antioksidasi protein biji melinjo terhidrolisis.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Konsentrasi Protein Biji Melinjo Terhidrolisis (Gg-PH)
- b. Jenis dan Konsentrasi Monosit
- c. Dosis perlakuan fMLP
- d. Prosedur laboratoris

3.4 Definisi Operasional

- a. Protein Biji Melinjo Terhidrolisis (Gg-PH)

Definisi operasionalnya adalah protein biji melinjo yang didapat dari hasil ekstraksi protein kasar biji melinjo kemudian dilakukan isolasi protein biji setelah itu dihidrolisis dengan enzim alkalase selama 5 jam dengan derajat hidrolisis, konsentrasi tertentu dan aktivitas antioksidannya sudah diuji dengan metode ABTS dan pirogalol.

- b. Aktivitas Antioksidasi Protein Biji Melinjo Terhidrolisis

Definisi operasionalnya adalah kemampuan protein biji melinjo terhidrolisis menangkap radikal superoksida monosit, ditunjukkan oleh berkurangnya produksi radikal superoksida yang diamati secara mikroskopis dan spektrofotometris.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut; sarung tangan, masker, pipet mikro, *syringe* dan jarum injeksi 5ml, inkubator *shaker*, *laminar*

flow, coverslip, deck glass, glass chamber, mikroskop binokuler, mikroskop inverted, vortex, centrifuse, autoclave, tourniquet, tabung falcon, spektrofotometer uv-vis, microplate reader, pH meter dan shaker, blender, gelas ukur, beker glass, dry block, dan water-bath.

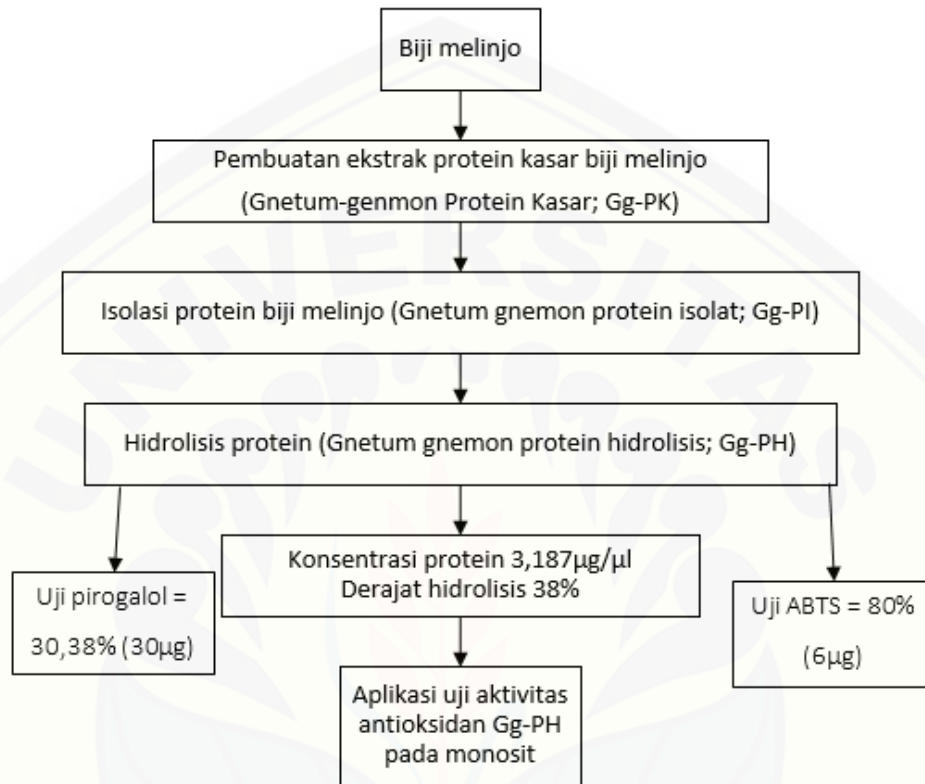
3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan untuk isolasi fraksi biji melinjo terhidrolisis adalah biji melinjo (*Gnetum gnemon Linn*), aquadest, buffer fosfat (Na), pH adjuster HCl 0,5M, pH adjuster NaOH 0,2M, alkalase, BSA, L-leucine, TNBS, bradford, sodium sulfid, pyrogallol, ABTS dan 2,45 mM kalium persulfat, etanol, glutathione (GSH) dan asam linoleat.

Bahan yang diperlukan untuk isolasi monosit adalah darah vena perifer (*heparinized whole blood*), HBSS (*Hanks Balance Salt Solution*), *Lymphocyte Separation Medium* (LSM) dan *ficoll-hypaque gradient 1.119*. Sedangkan untuk pengamatan aktivitas antioksidasi pada monosit *in vitro* diperlukan NBT (*Nitroblue Tetra Zolium*) dan fMLP (*N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine*).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Uji Aktivitas Antioksidan Gg-PH



Gambar 3.1 Prosedur penelitian uji aktivitas antioksidan Gg-PH

1. Pembuatan ekstrak protein kasar biji melinjo (*Gnetum-gnemon* Protein Kasar atau Gg-PK)

Pembuatan Gg-PK diawali dengan memilih buah melinjo yang matang fisiologis ditandai dengan kulit buah yang berwarna merah. Setelah itu kulit dikupas hingga terlihat kulit kedua yang berwarna kecoklatan dan keras, selanjutnya kulit berwarna putih kekuningan dikupas sampai bersih. Setelah itu biji melinjo yang berwarna putih ditimbang, kemudian diekstrak dengan aquadest dengan perbandingan 1 mg melinjo : 3 ml aquadest selama 30 menit. Biji melinjo dihaluskan menggunakan blender bersama dengan aquadest yang digunakan untuk ekstraksi sebelumnya, kemudian disaring dengan kassa. Setelah itu hasilnya disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm, selama 10

menit dalam suhu 15°C. Pisahkan supernatant dari pelet secara hati-hati, kemudian simpan dalam tube. Supernatan inilah yang disebut protein kasar biji melinjo (Gg-PK) (Siswoyo *et al.*, 2011).

2. Isolasi protein biji melinjo (*Gnetum-gnemon* Isolat Protein atau Gg-PI)

Isolasi protein dilakukan dengan metode *isoelectric precipitation* dengan cara mengubah pH larutan sehingga mencapai titik isoelektrik protein sehingga protein dapat mengendap dan terpisah dari larutan. Gg-PK diatur pHnya hingga menjadi pH 8 dengan menambahkan NaOH 0,2 M, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm, selama 10 menit dalam suhu 15°C kemudian ambil supernatant dan atur kembali pHnya hingga pH 4 dengan menambahkan HCl 0,5 M. Setelah itu setrifugasi kembali dengan kecepatan 10000 rpm, selama 10 menit pada suhu 15°C. Hasil sentrifugasi diambil peletnya, kemudian encerkan dengan aquadest setelah itu tambahkan NaOH 0,2 M hingga pH mencapai 8. Larutan inilah yang disebut protein isolat biji melinjo (Gg-PI) (Siswoyo *et al.*, 2011).

3. Hidrolisis protein isolat biji melinjo (*Gnetum-gnemon* Protein Hidrolisis atau Gg-PH)

Hidrolisis larutan Gg-PI dilakukan dengan menambahkan alkalase 20 µl yang telah diencerkan 10 kali dari stok, kemudian diinkubasi 50°C dengan pemanasan basah (*water bath*) selama 5 jam. Pada penelitian pendahuluan, diketahui bahwa waktu optimal untuk menghidrolisis Gg-PI adalah selama 5-8 jam, maka dilakukan hidrolisis enzim selama 5 jam. Setelah hidrolisis selama 5 jam, enzim alkalase dinonaktifkan dengan pemanasan kering suhu 95°C selama 10 menit. Selanjutnya Gg-PI disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 1 menit pada suhu 27°C lalu diambil supernatannya (Siswoyo *et al.*, 2011). Supernatant hasil hidrolisis inilah yang disebut protein biji melinjo terhidrolisis (*Gnetum gnemon* protein terhidrolisis atau Gg-PH).

4. Pengukuran derajat hidrolisis dan penentuan protein terlarut Gg-PH

Pengukuran derajat hidrolisis dilakukan untuk memastikan protein telah tercerna oleh enzim alkalase. Hal ini ditentukan dari hasil uji menggunakan *trinitro-benzene-sulfonic-acid* (TNBS). Pada dasarnya, metode ini menggunakan prinsip perubahan warna karena reaksi TNBS dan protein.

Pertama, siapkan sampel Gg-PI kemudian dihidrolisis total dengan asam kuat HCl selama 24 jam untuk mengetahui kandungan asam amino per 1 gram protein. Setelah itu Gg-PI hidrolisis total dan Gg-PH diuji dengan metode TNBS.

Siapkan Gg-PI hidrolisis total dan Gg-PH masing-masing 10 µl pada *tabung eppendorf* kemudian tambahkan 415 µl buffer fosfat pH 8 0,2 M dan 200 µl TNBS pada masing-masing tabung, setelah itu *divortex*, kemudian diinkubasi gelap pada suhu 50°C selama 30 menit. Setelah 30 menit inkubasi, tambahkan 400 µl sodium sulfit 0,1 M kemudian tunggu 15 menit. Perubahan warna dibaca dengan spektrofotometer, panjang gelombang 420 nm. Larutan 1,5 mM L-leucine digunakan sebagai standar untuk mengetahui konsentrasi α -aminonya.

Hasil absorbansi Gg-PI hidrolisis total dan Gg-PH dimasukkan pada rumus persamaan linear hasil uji standar L-leucine. Kemudian didapatkan nilai:

h : hasil persamaan linear absorbansi Gg-PH yang merepresentasikan jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis, didefinisikan sebagai konsentrasi milliekuivalen/g α -amino yang terbentuk saat hidrolisis.

h_{tot} : hasil persamaan linear Gg-PI hidrolisis total yang menunjukkan kandungan asam amino per 1 gram protein.

Kemudian derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan rumus:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

Penentuan protein terlarut dilakukan dengan metode Bradford. Prinsip kerjanya adalah pengikatan *Coomasie Brilliant Blue G250* (CBBG) oleh molekul protein. CBBG bebas berwarna merah kecoklatan, dalam suasana basa CBBG akan berbentuk anion dan mengikat protein dan membentuk warna biru.

Gg-PH sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 45 µl aquabidest lalu ditambah 950 µl larutan Bradford, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Hasilnya dibandingkan dengan standar *Bovine Serum* (BSA) untuk mengetahui konsentrasi protein terlarut (Siswoyo *et al.*, 2011).

5. Uji ABTS

Uji aktivitas antioksidasi Gg-PH dengan reagen *2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* (ABTS) dilakukan untuk mengetahui potensi antioksidasi Gg-PH secara umum. Prinsipnya Gg-PH ditambahkan ke dalam ABTS yaitu agen produksi radikal bebas, kemudian kemampuan inhibisi Gg-PH terhadap radikal bebas diukur untuk menentukan kemampuan antioksidan Gg-PH.

Larutan ABTS dipersiapkan dengan konsentrasi final 7 mM dan 2,45 mM kalium persulfat. Pencampuran keduanya dilakukan dalam ruang gelap pada suhu ruang, 12-16 jam sebelum digunakan. ABTS diencerkan dengan 0,2 M *buffer phosphate saline* (PBS) pH 7,4. Kemudian ABTS diukur absorbansinya dengan spektrofotometri hingga absorbansi kurang lebih 0,7-0,8. Gg-PH ditambahkan pada ABTS yang sudah diukur absorbansinya kemudian divortex. Absorbansi ABTS diamati dengan panjang gelombang 734 nm, sebagai pembanding, aktivitas peredaman ABTS, dilakukan tes terhadap *glutathion*. Hasil uji ABTS dihitung dengan rumus:

$$\left[\frac{Ac - As}{Ac} \right] 100\%$$

Ac adalah absorbansi kontrol, sedangkan As adalah absorbansi Gg-PH (Siswoyo *et al.*, 2011).

Hasil uji dinyatakan dalam persen *scavenging*. Semakin besar persen *scavenging* semakin potensial suatu senyawa dalam meredam radikal bebas.

6. Uji pirogalol

Uji peredaman model radikal superoksida dilakukan dengan menggunakan reagen pirogalol. Pirogalol adalah senyawa yang tidak berwarna, pada suasana basa pirogalol mengalami autooksidasi dan menghasilkan radikal superoksida dan orthoquinon (II). Orthoquinon kemudian dioksidasi radikal bebas dan menghasilkan purpulloalgin (*2,3,4,6-tetrahydroxy-5H-benzocycloheptene-5-one, III*) yang berwarna jingga.

Gg-PH dicampur dengan 50 mM Tris-HCl pH 8,2. Kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam suhu 25°C, kemudian ditambahkan 0,1 ml pyrogallol 10 mM yang dilarutkan pada 10 mM HCl.

Absorbansi diamati dengan *UV-visible spectrophotometer* selama 4 menit dengan panjang gelombang 320nm. Tingkat oksidasi pirogalol Gg-PH dihitung sebagai kemiringan garis absorbansi atau *slope* (ΔA_s), tingkat autooksidasi pirogalol kontrol diukur dengan 1 ml aquabidest (ΔA_c) (Siswoyo *et al.*, 2011). Peredaman radikal superoksida dihitung dengan rumus:

$$\left[\frac{\Delta A_0 - \Delta A_s}{\Delta A_0} \right] \times 100\%$$

Hasil uji dinyatakan dalam persen. Semakin besar persen *scavenging* semakin potensial suatu senyawa dalam meredam radikal bebas (Siswoyo *et al.*, 2011).

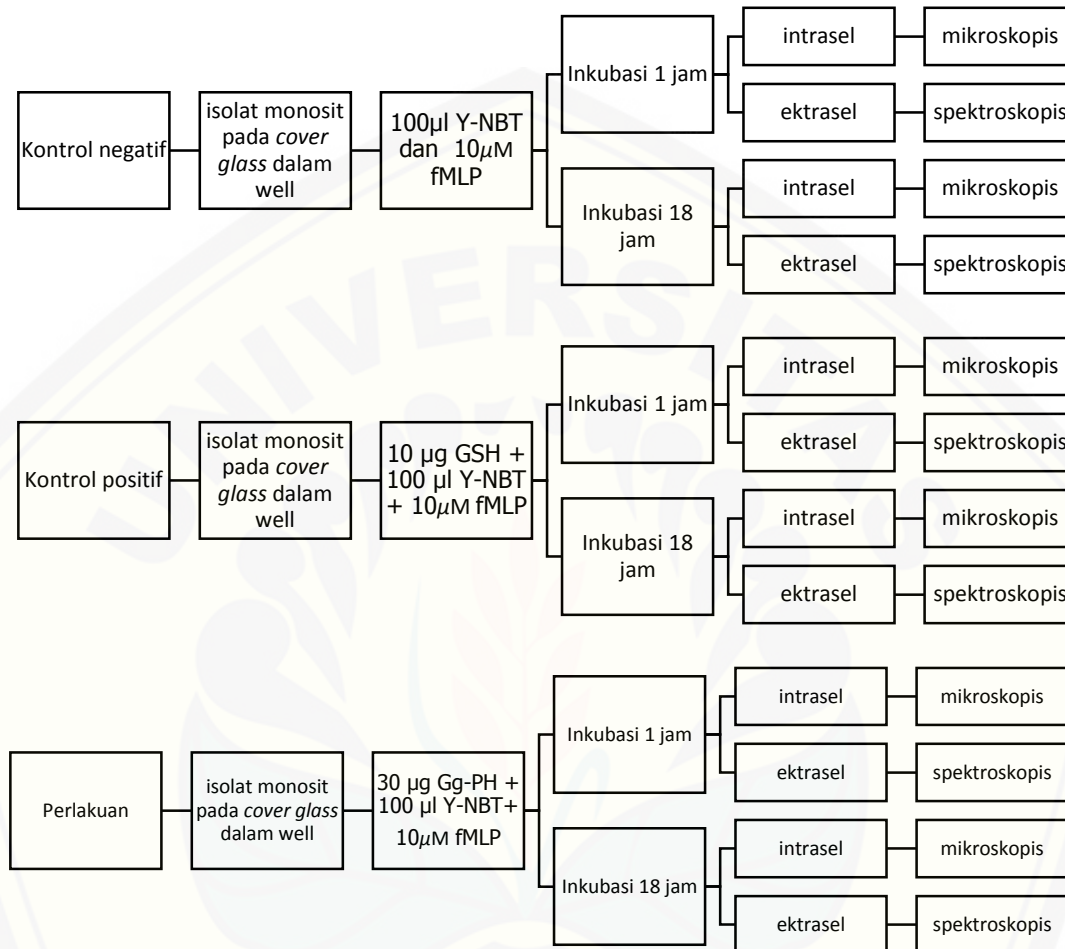
3.6.2 Uji Aktivitas Antioksidan Gg-PH pada Monosit

Kelompok penelitian dibagi menjadi 3 yaitu:

1. Kelompok kontrol negatif: Isolat monosit + NBT (*Nitroblue tetrazolium*) + fMLP

2. Kelompok kontrol positif: Isolat monosit + antioksidan glutathione (GSH) + NBT + fMLP
3. Kelompok perlakuan: Isolat monosit + Gg-PH + NBT + fMLP

Masing-masing kelompok kemudian dibagi lagi menjadi 2 kelompok pengamatan yaitu kelompok pengamatan inkubasi 1 jam dan 18 jam. Dasar dilakukannya pengamatan inkubasi pada 1 jam dan 18 jam merujuk pada hasil penelitian pendahuluan. Hasil penelitian pendahuluan, diketahui dari waktu inkubasi monosit dengan pemaparan fMLP dan Gg-PH selama 1 jam tidak terlihat produksi radikal superoksida pada ekstraseluler sehingga peneliti memutuskan untuk melakukan pengamatan setelah inkubasi 18 jam tanpa menghilangkan stimulan produksi radikal superoksida.



Gambar 3.2 Kelompok penelitian uji aktivitas Gg-PH pada monosit metode NBT

Uji aktivitas antioksidan protein biji melinjo terhidrolisis pada monosit dilakukan dengan metode NBT (*Nitroblue Tetrazolium*). Pertama, dilakukan isolasi monosit dengan metode *single-ficoll* sel diinkubasi dengan fMLP dan diaplikasikan NBT untuk mengetahui produksi radikal superoksida. Aktivitas antioksidan diketahui dengan berkurangnya produksi radikal superoksida dibandingkan kontrol.

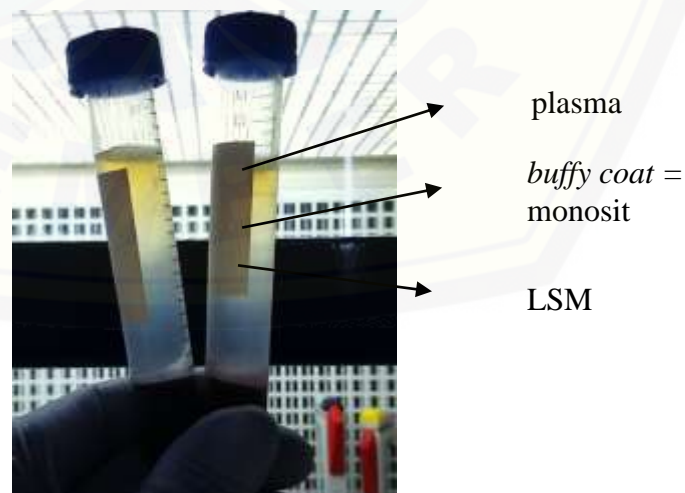
1. Isolasi Monosit

Siapkan 12 ml darah yang diambil dari vena cubiti responden usia 18-40 tahun, sehat, tidak memiliki riwayat penyakit sistemik, riwayat kelainan darah, riwayat alergi, kebiasaan merokok, kebiasaan minum minuman keras atau yang mengandung alkohol dan dalam keadaan sehat.

Masukkan darah vena ke tabung heparin masing-masing 4 ml, setelah itu digoyang-goyangkan agar darah bercampur dengan antikoagulan. Selanjutnya darah disentrifugasi 600 rpm selama 10 menit untuk memisahkan plasma dari sel darah dan mengurangi kontaminasi platelet, kemudian plasma diaspirasi dan dibuang.

Siapkan tabung falcon lain, tambahkan 3 ml *ficoll hypaque* 1.119 secara hati-hati pada tabung falcon yang sudah disediakan, dengan teknik ujung pipet ditempelkan pada dinding tabung, dan disemprotkan secara perlahan-lahan untuk mencegah pecahnya *ficoll*, kemudian, lapiskan 3 ml *Lymphocyte Separate Medium* (LSM) diatas *ficoll hypaque* 1.119.

Setelah itu, lapiskan 6 ml darah di atas gradient tabung tadi. Sentrifugasi dengan kecepatan 1900 rpm selama 30 menit pada suhu ruang kemudian lakukan pengamatan lapisan *buffy coat* yang terbentuk. Sel mononuklear berada pada lapisan atas diantara plasma dan LSM.



Gambar 3.3 Gambar hasil sentrifugasi isolasi monosit dari darah vena perifer

Plasma yang terbentuk diatas mononuklear diaspirasi dan dibuang. *Buffy coat* yang mengandung mononuklear diaspirasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon yang lain. Suspensi monosit kemudian dicuci dua kali menggunakan HBSS 700 μ l dan disentrifugasi pada kecepatan 1400 rpm selama 10 menit pada suhu ruang kemudian supernatan hasil sentrifugasi dibuang. Pelet monosit diresuspensi dengan menggunakan 600 μ l HBSS. Ambil monosit 50 μ l dan diteteskan pada *object glass* lalu diamati dibawah mikroskop untuk melihat populasi.

2. Pemaparan monosit dengan Gg-PH

Pengukuran produksi radikal superoksida dilakukan dengan metode uji NBT konvensional. Uji NBT (*Nitroblue Tetra Zolium*) digunakan untuk mengetahui kemampuan sel fagosit memproduksi radikal superoksida.

Pertama-tama siapkan *cover glass* steril. *Cover glass* kemudian diletakkan pada masing-masing *chamber* dalam well 12. Monosit yang disuspensikan dalam HBSS diambil sebanyak 100 μ l, ditempelkan pada *cover glass* dalam well. Diamkan selama 5-15 menit tanpa dimasukkan inkubator supaya monosit menempel pada *cover glass*.

Siapkan antibiotik 20 μ l/ml dan antijamur 5 μ l/ml kemudian ditambahkan ke HBSS. Larutan tersebut kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing *chamber* yang sudah berisi monosit sebanyak 600 μ l atau sampai tergenang. Kemudian diinkubasi dalam inkubator 37 °C untuk penempelan sel selama 35 menit. Setelah itu medium HBSS dibuang dan dilakukan pencucian dengan HBSS hingga bersih bebas kontaminan seperti platelet dan sel darah merah yang diperiksa dengan mikroskop inverted. Setelah itu monosit kemudian diresuspensi kembali dengan 650 μ l pada kelompok fMLP (monosit tanpa antioksidan yang distimulasi antigen fMLP) sedangkan resuspensi 550 μ l HBSS dilakukan pada kelompok GSH (monosit dengan

perlakuan antioksidan GSH dan stimulasi antigen fMLP), dan Gg-PH (monosit dengan perlakuan protein biji melinjo Gg-PH dan stimulasi antigen fMLP).

Monosit pada semua kelompok yang sudah menempel pada well didiamkan selama 15 menit supaya monosit dalam keadaan *resting* kemudian ditambahkan 100 μ l GSH konsentrasi 10 μ g pada kelompok GSH (kontrol positif) dan ditambahkan 100 μ l Gg-PH konsentrasi 30 μ g pada kelompok Gg-PH (kelompok perlakuan). Kelompok tersebut diinkubasi dalam *incubator shaker* selama 30 menit.

Sebelum ditambahkan 100 μ l fMLP (10 μ M) dan 250 μ l Y-NBT (*yellow-Nitroblue tetrazolium*), monosit didiamkan 15 menit dahulu. Setelah penambahan fMLP dan Y-NBT, masing-masing kelompok dibagi menjadi 2 yaitu kelompok inkubasi 1 jam dan 18 jam. Kelompok tersebut diinkubasi dalam *incubator shaker*.

3. Penghitungan radikal superoksida monosit ekstra seluler

Setelah inkubasi, bentukan superoksida ekstrasel pada medium dipindahkan ke *well-plate* 96 sebanyak 200 μ l tiap *well* dan absorbansi diamati dengan *microplate reader* panjang gelombang 630nm. Hasil absorbansi tiap kelompok kemudian dijumlah dan dirata-rata.

4. Penghitungan radikal superoksida monosit intra seluler

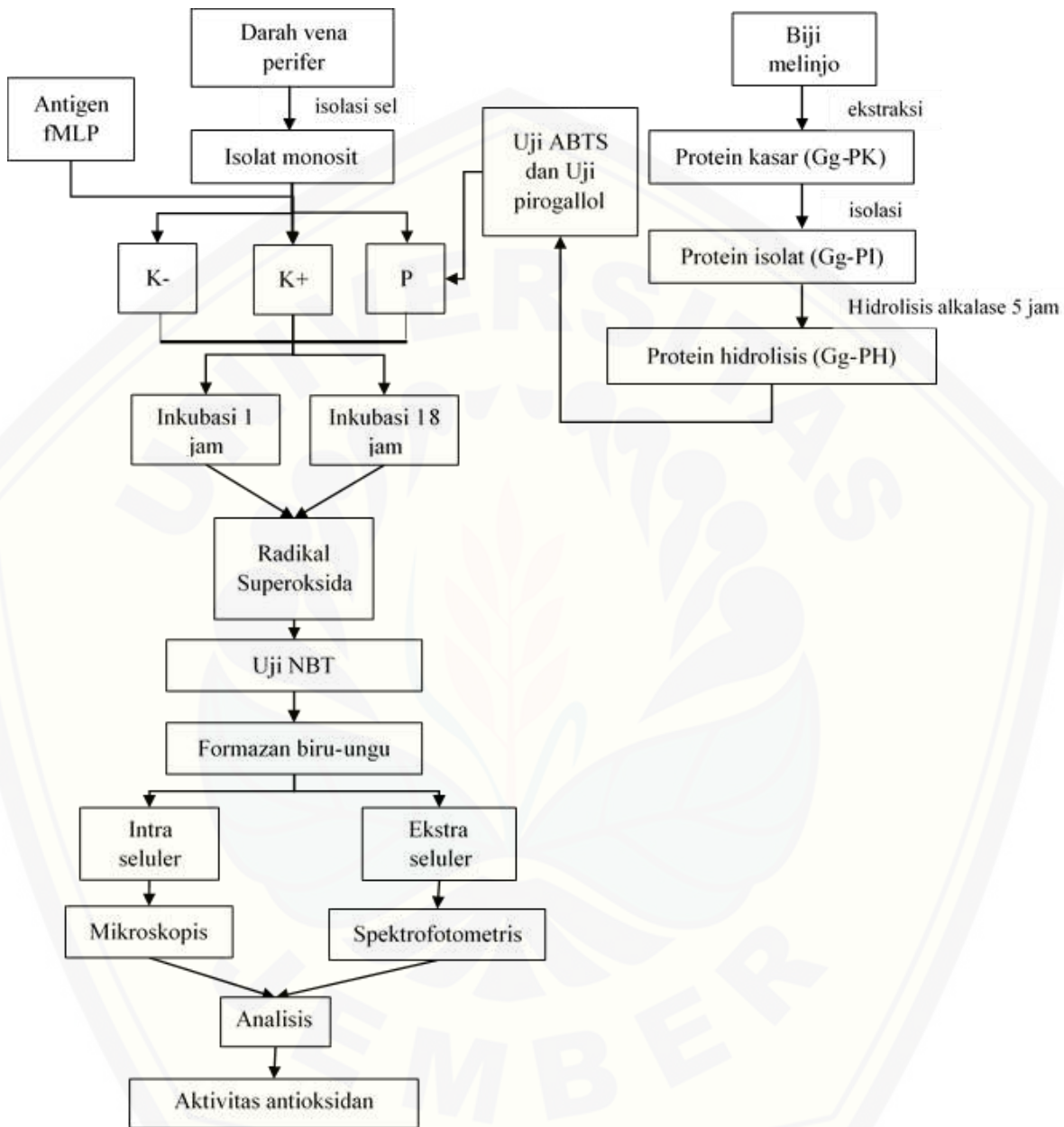
Setelah medium diambil, monosit pada *cover glass* dibilas dengan HBSS, kemudian difiksasi dengan methanol, lalu diangin-anginkan. Pewarnaan *counter stain* dilakukan dengan safranin. Kemudian presentase sel yang mengandung partikel formazan berwarna kebiruan pada intrasel monosit dievaluasi dengan mikroskop binokuler perbesaran 1000x dengan bantuan optilab dan *image raster*. 100 monosit secara acak didapatkan dari 3-5 lapang pandang pada tiap kelompok. Presentase monosit yang memproduksi radikal

superoksida intrasel dihitung oleh tiga orang pengamat, kemudian hasilnya dirata-rata. Aktivitas antioksidan dapat diketahui dengan tidak ada formazan biru-ungu pada sekitar membran monosit (Yagisawa *et al.*, 1996; Sim *et al.*, 2006).

3.7 Analisis Data

Pada penelitian ini data yang didapatkan yaitu hasil rata-rata absorbansi radikal superoksida ekstraseluler pada inkubasi 1 dan 18 jam dan hasil rata-rata presentase monosit yang memproduksi radikal superoksida intra seluler pada inkubasi 1 dan 18 jam tiap 100 sel diuji normalitas dan homogenitas. Data normal dan homogen kemudian dianalisis dengan MANOVA (*Multivariate analysis of variance*) dengan aplikasi Minitab 17. Data rata-rata presentase monosit yang memproduksi radikal superoksida intra seluler terdapat beda nyata maka dilanjutkan dengan Uji *Honesty Significant Difference* (HSD).

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur penelitian

- K - : Kelompok monosit + fMLP
- K + : Kelompok monosit + GSH + fMLP
- P : Kelompok monosit + Gg-PH + fMLP

BAB 5. PENUTUP

5.1 KESIMPULAN

Berdasar hasil penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) dapat meredam produksi radikal superoksida monosit pada inkubasi 1 jam namun tidak pada inkubasi 18 jam.
2. Terdapat beda nyata aktivitas antioksidan biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) pada monosit yang diinkubasi 1 jam dengan inkubasi 18 jam. Dalam kurun waktu 18 jam terjadi stres oksidatif sedangkan Gg-PH tidak mampu menetralkan radikal superoksida yang terus terbentuk.

5.2 SARAN

1. Perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut dan modifikasi uji radikal superoksida ekstra seluler dengan spektrofotometri uv-vis.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis, durasi dan toksisitas protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH).
3. Perlu diteliti lebih lanjut mengenai jenis protein biji melinjo terhidrolisis yang paling efektif untuk meredam radikal superoksida dan memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2011. Melinjo. <http://www.melinjo.net>. [diakses 9 Mei 2015].
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. 2012. Cellular and Molecular Immunology Seventh Edition. Elsevier Health Sciences.
- Adler dan Nissen, J. 1979. Determination of The Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.27 No.6, Hal.1256-1262.
- Akib, A.A., Munasir, Z. and Kurniati, N. 2008. Buku Ajar Alergi-Imunologi Anak. Ed.2, Hal.39-49.
- Arief, S. 2006. Radikal Bebas. *Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK Unair/RS. Dr. Sutomo, Surabaya*.
- Alen, B. 1967. *Malayan Fruit*. Donal Moore Press: Singapore.
- Beigier-Bompadre, M., Barrionuevo, P., Alves-Rosa, F., Rubel, C.J., Palermo, M.S. and Isturiz, M.A. 2001. N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine Inhibits both Gamma Interferon-and Interleukin-10-Induced Expression of FcγRI on Human Monocytes. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, Vol.8 No.2, Hal.402-408.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, Vol.5 No.1, Hal.9.
- Cathcart, M. K. 2004. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages contributions to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Vol.24, No.1, Hal.23-28.
- Dixon, Malcomm., Webb, Edwin C. 1990. *Methods In Enzymology* Third Edition. San Diego, California: Academic Press Inc.

- Elias, R.J., Kellerby, S.S. and Decker, E.A., 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, Vol.48, No.5, Hal.430-441.
- Eroschenko, V., & Fiore, M. 2008. *Difiore's Atlas of Histology with Functional Correlation*. 11th. Baltimore: Williams & Wilkins, Hal.106.
- Guyton, Arthur C., Hall, John E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Edisi ke 11. Philadelphia: Elsevier Inc. Hal.431-432
- Halliwell, B., 2005. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. eLS.
- Hardwick, S.J., Carpenter, K.L., Allen, E.A. and Mitchinson, M.J., 1999. Glutathione (GSH) and The Toxicity of Oxidised Low-Density Lipoprotein to Human Monocyte-Macrophages. *Free radical research*, Vol.30, No.1, Hal.11-19.
- Hendayana. 1994. *Kimia Analitik Instrumen*. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Hernani, Rahardjo M. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Kato, E., Tokunaga, Y., dan Sakan, F. 2009. Stilbenoids Isolated from The Seeds of Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) and their Biological Activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, Vol.57, No.6, Hal.2544-2549.
- Watanabe, K., Shibuya, S., Ozawa, Y., Izuo ,N., Shimizu, T. 2014. Resveratrol Derivative-Rich Melinjo Seed Extract Attenuates Skin Atrophy in Sod1-Deficient Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 391075, in press.
- Kong, J., Yu, S. 2007. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis Protein Secondary Structure. *Acta Biochem* Vol.39, No.8, Hal.548-559
- Kumar, V., Abbas, A.K. and Aster, J.C., 2015. *Buku Ajar Patologi Robbins Edisi 9*. Diterjemahkan oleh Nasar, I.M., Cornain, S. Elsevier.
- Leeson, T.S, *et al.* 1996. *Buku Ajar Histologi Edisi V*. Jakarta: EGC.
- Leong, L.P dan Shui. G. 2002. An Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry*, Vol.76, Hal.69–75.
- Lim, T. K. 2012. Edible Medicinal and Non-medicinal Plants: Vol. 3, Fruits. Springer Science & Business Media. Hal.45-50

- Manner, H. I., & Elevitch, C. R. 2006. *Gnetum gnemon* (gnemon), ver. 1.1. *Species profiles for Pacific Island Agroforestry. Permanent Agriculture Resources (PAR), Holualoa, Hawaii*. [i. http://www.traditionaltree.org](http://www.traditionaltree.org).
- Mehta, A., Tuli, R., Chintamaneni, M., & Kuar, G. 2009. Antioxidants: The Need of Hour. *Pharmacology*, Vol.206, Hal.650-677.
- Mine, Y., Li-Chan, E. and Jiang, B. eds., 2011. *Bioactive Proteins and Peptides as Functional Foods and Nutraceuticals* Vol. 2. John Wiley & Sons.
- Nurfadillah, Zahrina A E. 2016. *Aktivitas Fraksi Protein Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) Terhidrolisis terhadap Radikal Hidroksil secara In Vitro*. Skripsi. Universitas Jember.
- Nurkomarasari, Risa. 2010. *Penentuan Kadar Fe (II) dalam Sampel dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-VIS*. Universitas Pendidikan Indonesia Bandung
- Ortiz, S. E. M., & Wagner, J. R. 2002. Hydrolysates of Native and Modified Soy Protein Isolates: Structural Characteristics, Solubility and Foaming Properties. *Food Research International*, Vol.35, No.6. Hal.511-518.
- Ratnaparkhi, M.P., Chaudhari, S.P. and Pandya, V.A. 2011. Peptides and Proteins in Pharmaceuticals. *Int. J. Curr. Pharm. Res*, Vol.3, No.2, Hal.1-9.
- Percival, M. 1998. Antioxidants Clinical Nutrition Insights. *NUT031*, 1, 96.
- Poli, Paul S. 2011. *Komunikasi Sel dalam Biologi Molekular: Jalur Sinyal dan Implikasi Klinis*. Jakarta: EGC.
- Rahardja, P.C. 1982. *Bertanam Melinjo*. Penebar Swadaya: Bogor.
- Rohmatussolihat. 2009. Antioksidan, Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia. *BioTrends* Vol.4 No.1.
- Saha, P., dan Geissmann, F. 2011. Toward A Functional Characterization of Blood Monocytes. *Immunology and Cell Biology*, Vol.89, No.1, Hal.2-4.
- Sim Choi, H., Woo Kim, J., Cha, Y. N., & Kim, C. 2006. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, Vol.27, Vol.1, Hal.31-44.

- Siswoyo, T A., Aldino, M., Ningsih W. 2007. Isolasi Protein Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*). *Seminar Nasional PATPI Bandung*. ISBN: 978-979-16456-0-7: Hal.1045-1052.
- Siswoyo, T. A., Mardiana, E., Lee, K. O., & Hoshokawa, K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.59, No.10, Hal.5648-5656.
- Sunanto, H. 1991. *Budidaya Melinjo dan Usaha Produksi Emping*. Kanisius.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. and Tapiero, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol.57, No.3, Hal.145-155.
- Winarsi, H. 2005. *Antioksidan Alami dan Radikal*. Kanisius.
- Wintrobe, M. M. 2014. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Edisi ke 13. J. P. Greer (Ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Whitford, D., 2013. *Proteins: structure and function*. John Wiley & Sons.
- Yagisawa, M., Yuo, A., Yonemaru, M., Imajoh-Ohmi, S., Kanegasaki, S., Yazaki, Y., & Takaku, F. 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*, Vol.228, No.2, Hal 510-516.
- Yona, S., & Jung, S. 2010. Monocytes: Subsets, Origins, Fates and Functions. *Current Opinion in Hematology*.

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 $z = 1,96$

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

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

$$n = 1,96^2$$

$$n = 3,84$$

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

Lampiran B. Surat Ijin Penelitian



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

Nomor : 434/UN25.8/TL/2015
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth,
Kepala Center of 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 | : Izza Khalida |
| 2. NIM | : 121610101078 |
| 3. Tahun Akademik | : 2015/2016 |
| 4. Fakultas | : Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5. Alamat | : Jl. Kalimantan No. 24 Jember |
| 6. Judul Penelitian | : Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum Gnemon L</i>) Tehidrolisis Terhadap Radikal Superoksida Monosit In Vitro |
| 7. Lokasi Penelitian | : CDAST Universitas Jember |
| 8. Data/Alat yg dipinjam | : Water-bath, microplate reader, pipet mikro, timbangan, spektrofotometer, dll |
| 9. Waktu | : Nopember 2015 s/d Selesai |
| 10. Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Uji Aktivitas Antioksidan Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum Gnemon L</i>) Tehidrolisis Terhadap Radikal Superoksida Monosit 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, 18 NOV 2015
an. Dekan
Pembantu Dekan I



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



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 813336, Faks 811791

Nomor : 25/UN25.8/JUL/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 | : Izza Khalida |
| 2. NIM | : 121610101078 |
| 3. Tahun Akademik | : 2014/2015 |
| 4. Fakultas | : Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5. Alamat | : Jl. Kalimantan No. 24 Jember |
| 6. Judul Penelitian | : Uji Efektivitas Fraksi Protein Biji Melinjo Terhidrolisis Sebagai Antioksidan Super Oksida Sel Monosit In Vitro |
| 7. Lokasi Penelitian | : Lab Bioscience RSGM Universitas Jember |
| 8. Data/Alat yg dipinjam | : Sentrifuge vertical, incubator shaker, mikroskop, dll |
| 9. Waktu | : Juli 2015 s/d Selesai |
| 10. Tujuan Penelitian | : Untuk Mengetahui Uji Efektivitas Fraksi Protein Biji Melinjo Terhidrolisis Sebagai Antioksidan Super Oksida Sel Monosit In Vitro |
| 11. Dosen Pembimbing | : 1. Dr. ceg. IDA Susilawati, M.Kes
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP, M.Agr. Ph.D |

Demikian atas perhatian dan kerjasana yang baik disampaikan terima kasih.



Dr. H. Cahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Prost
 NIP. 19690112199601001

Lampiran C. Surat persetujuan subyek penelitian dan *ethical approva*

SURAT PERSETUJUAN
INFORMED CONSENT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

nama : Malan Nawrodi,
umur : 21 tahun
jenis kelamin : L

Menyatakan bersedia untuk menjadi subyek penelitian dari :

nama : Izza Khalida
NIM : 121610101078
fakultas : Kedokteran Gigi
alamat : Jalan Kalimantan no 24 Jember

dengan judul penelitian "Uji Aktivitas Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* Linn) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Monosit 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


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 Izza Khalida atau Dr. drg. I D A Susitawati, M.Kes. Dengan menandatangani formulir ini, saya setuju untuk ikut serta dalam penelitian ini

Jember, 6 Januari 2016

Responden


Khalida N
(Nama Terang)

Saksi


A. A. Itri Pujiati Sari Dewi
(Nama Terang)



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Kalimantan 37 - Kampus Bumi Tegal Boto Jember 68121
Telepon (0331) 337877, 324446 *Faksimile (0331) 337877, 324446
E-mail : fk@unej.ac.id

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK
ETHICAL APPROVAL

Nomor : 761/H25.1.11/KE/2016

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 ANTIOKSIDA BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
TERHADAP RADIKAL SUPEROKSIDA MONOSIT IN VITRO**

Nama Peneliti Utama : Izza Khalida (Nim: 121610101078)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Name of institution

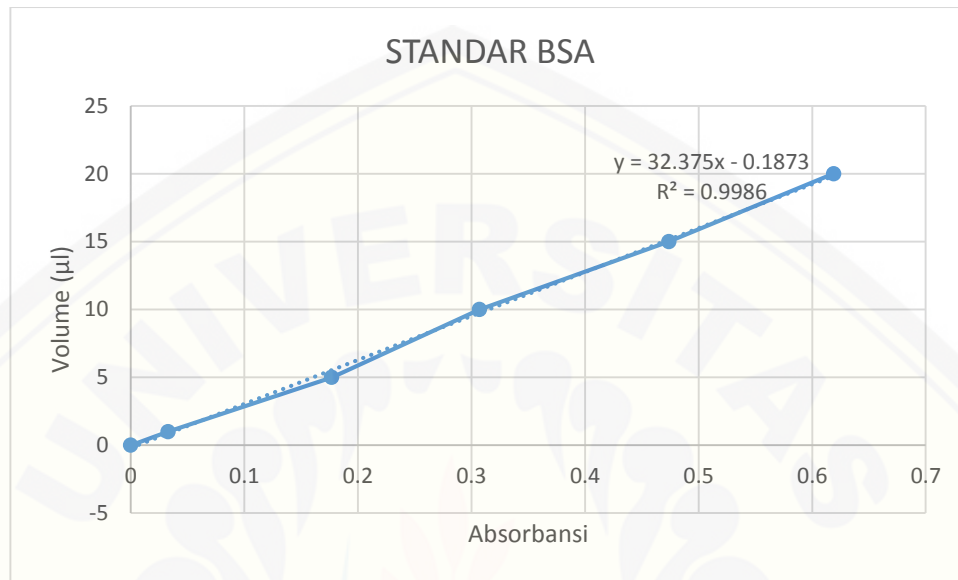
Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 11 Februari 2016



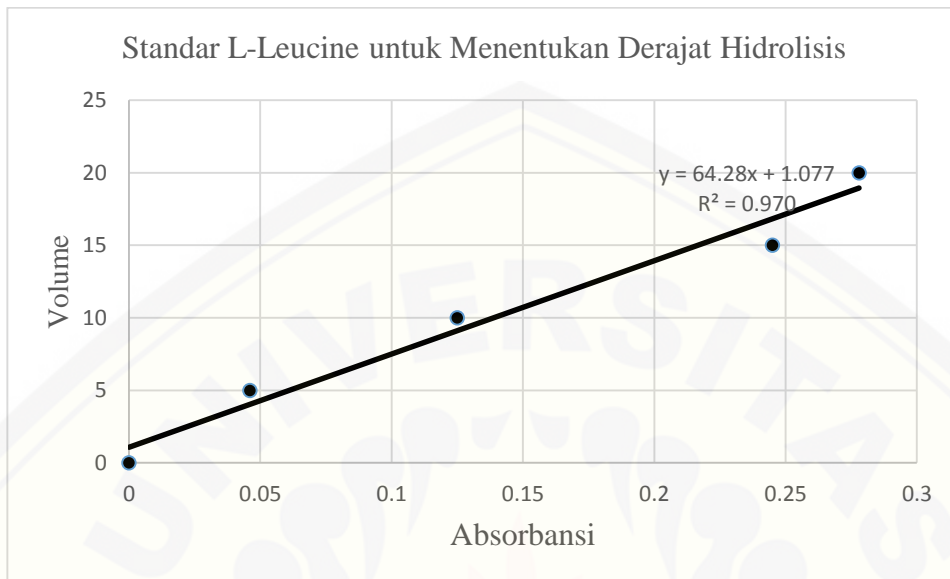
Lampiran D. Penghitungan konsentrasi protein dan derajat hidrolisis

Penghitungan konsentrasi protein



	Volume (μ l)	Rerata Absorbansi	Konsentrasi Protein	
			(μ g/ μ l)	mg
Protein Kasar (Gg-PK)	320000	0.801	5.148	1647.45
Protein Isolat (Gg-PI)	60000	0.920	5.919	355.12
Protein Hidrolisis (Gg-PH)	8750	0.498	3.187	27.88

Penghitungan derajat hidrolisis Gg-PH



	Absorbansi			Asam Amino (μl)				SD	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%

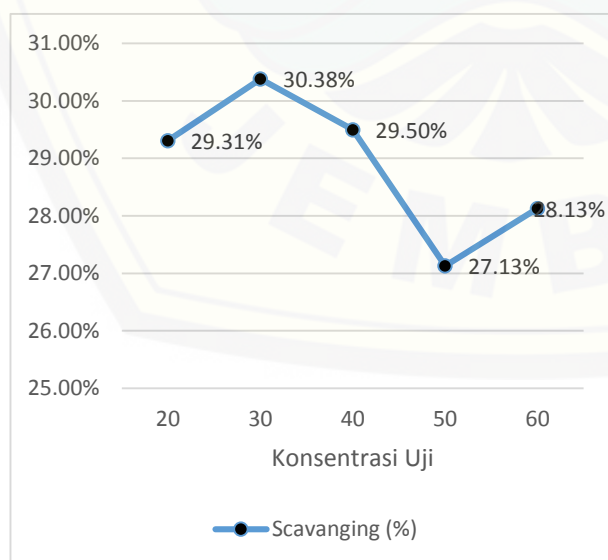
Lampiran E. Hasil uji ABTS dan uji pirogalol

Hasil uji ABTS

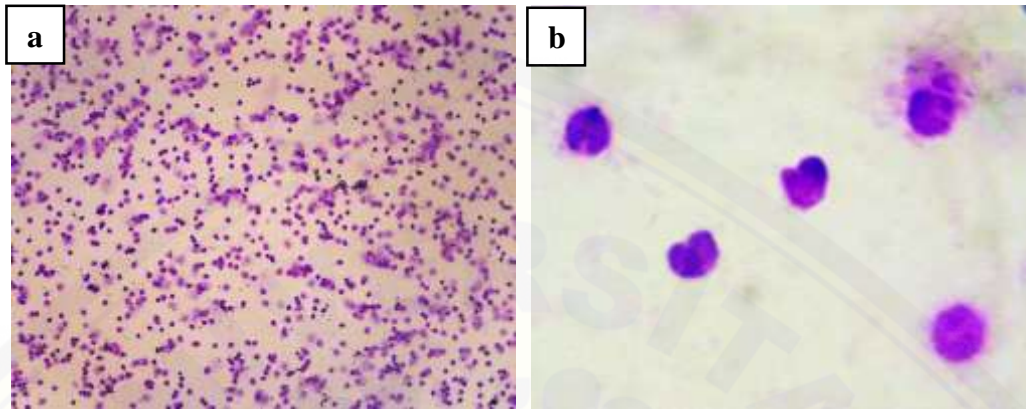
	Konsentrasi Uji (μg)	Abs			Rata-rata	SD	%
		1	2	3			
Blanko	6	0.35	0.40	0.37	0.37	0.027	0%
Gg-PK	6	0.22	0.22	0.22	0.22	0.002	41%
Gg-PI	6	0.17	0.10	0.11	0.13	0.036	66%
Gg-PH	6	0.07	0.07	0.08	0.07	0.002	80%

Hasil uji autooksidasi pirogallol

Konsentrasi Uji (μg)	Rata-rata Slope	Scavanging %
20	0.1131	29.31%
30	0.1114	30.38%
40	0.1128	29.50%
50	0.1166	27.13%
60	0.1150	28.13%



Lampiran F. Gambaran mikroskopik hasil isolasi monosit darah vena perifer pengecatan giemsa

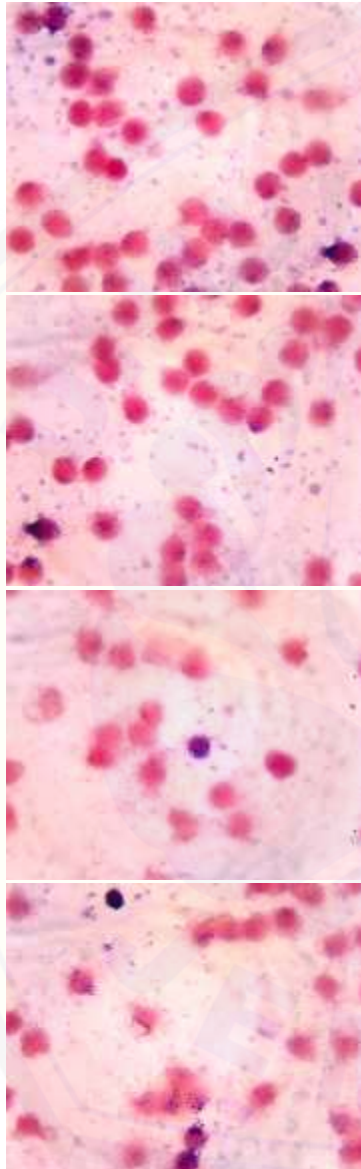


Gambaran mikroskopis monosit pengecatan giemsa perbesaran (a) 100x, (b) 400x

Lampiran G. Gambaran mikroskopis monosit yang memproduksi radikal superoksida

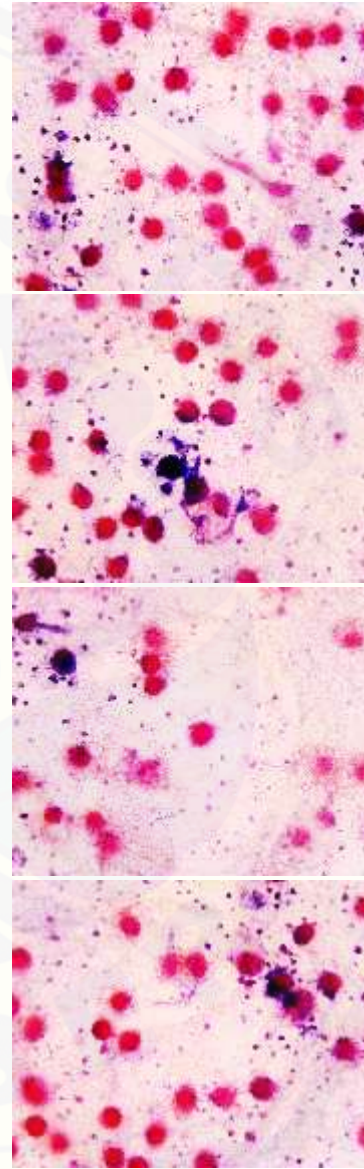
Kelompok fMLP inkubasi 1 jam

1

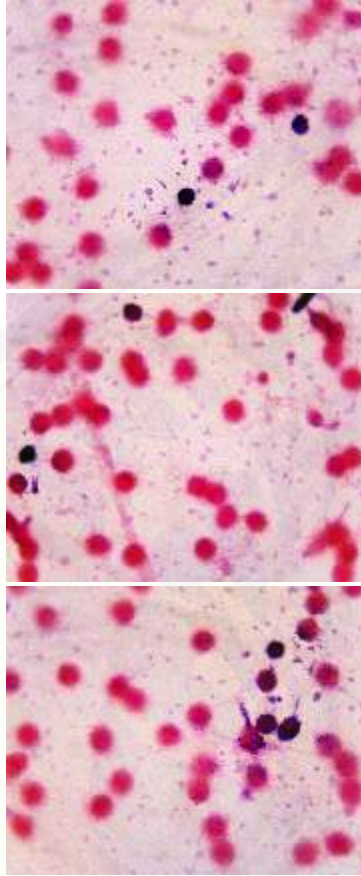
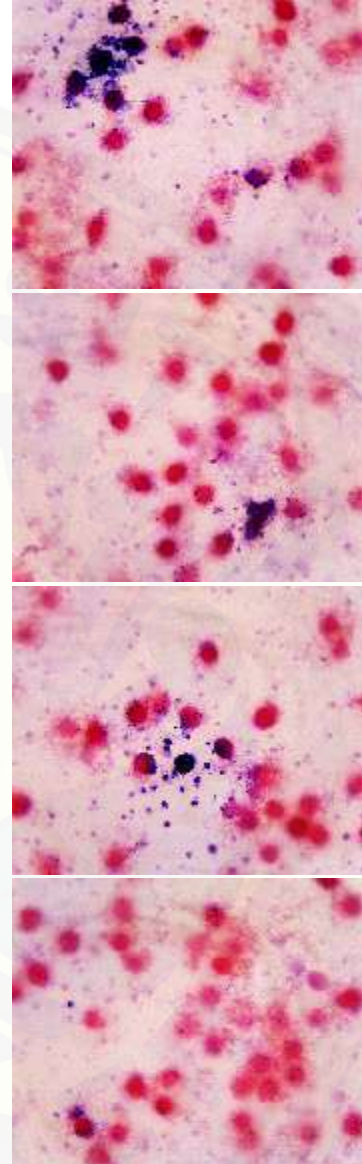


Kelompok fMLP inkubasi 18 jam

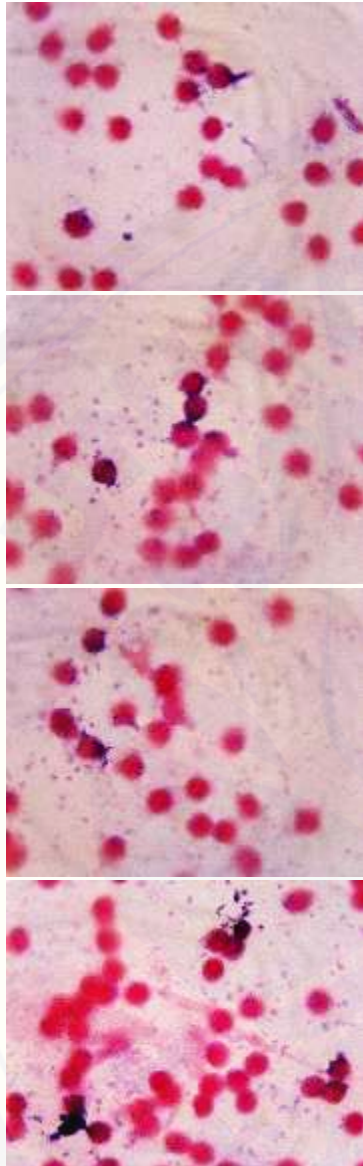
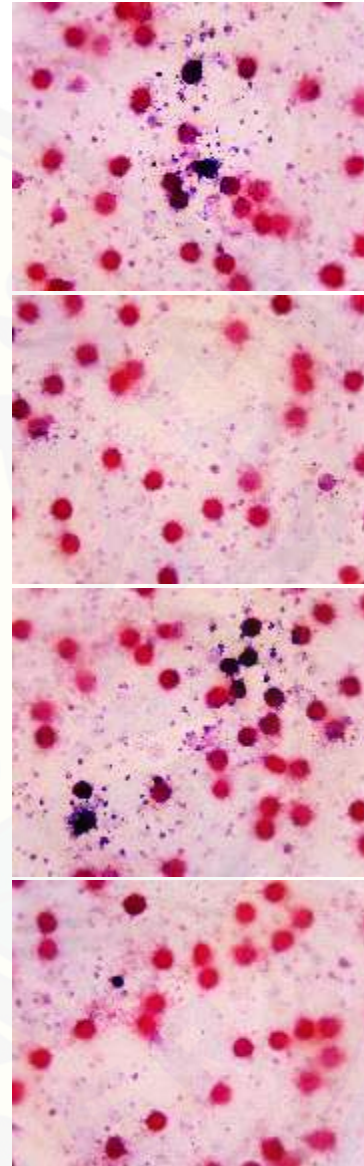
1



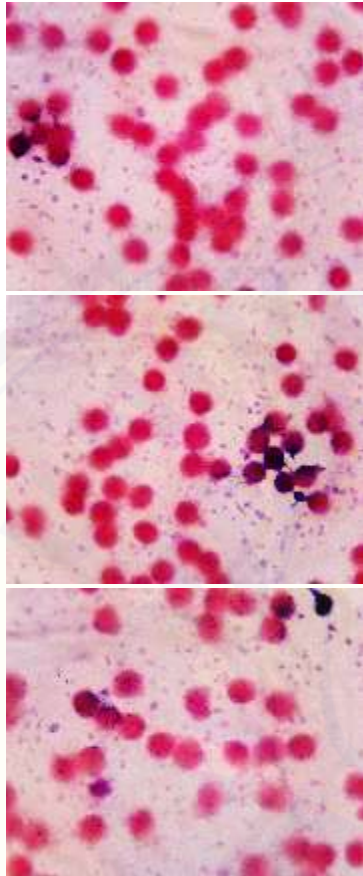
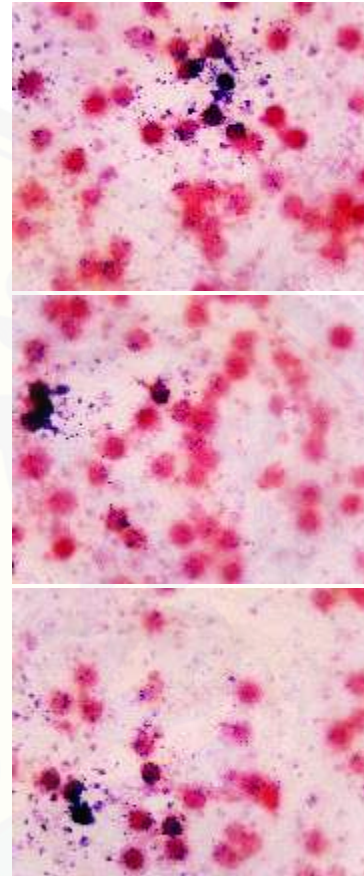
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang hanya diberi fMLP tanpa dipapar antioksidan, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok fMLP inkubasi 1 jam
2Kelompok fMLP inkubasi 18 jam
2

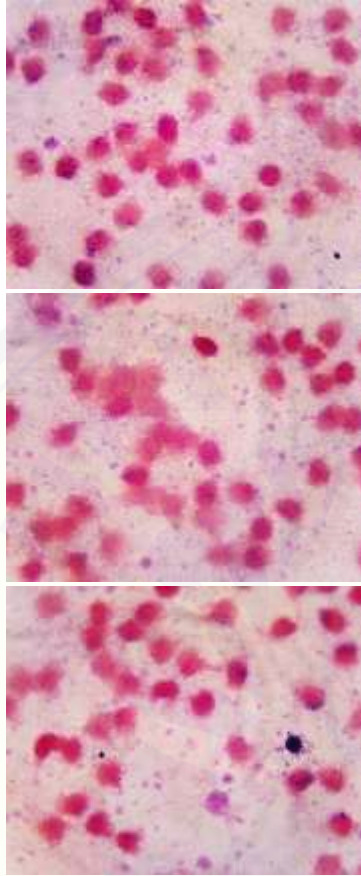
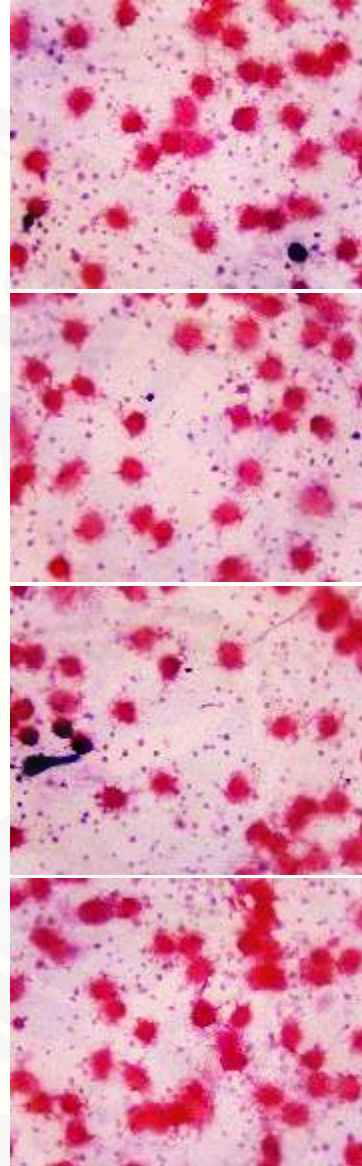
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang hanya diberi fMLP tanpa dipapar antioksidan, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok fMLP inkubasi 1 jam
3Kelompok fMLP inkubasi 18 jam
3

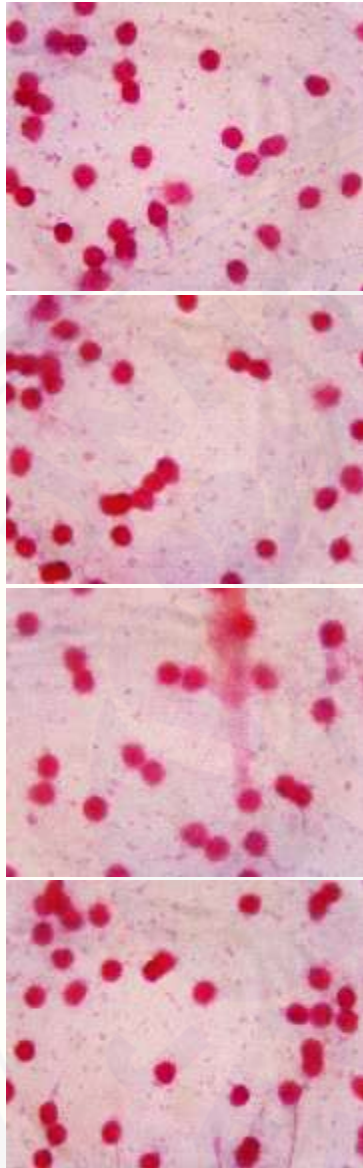
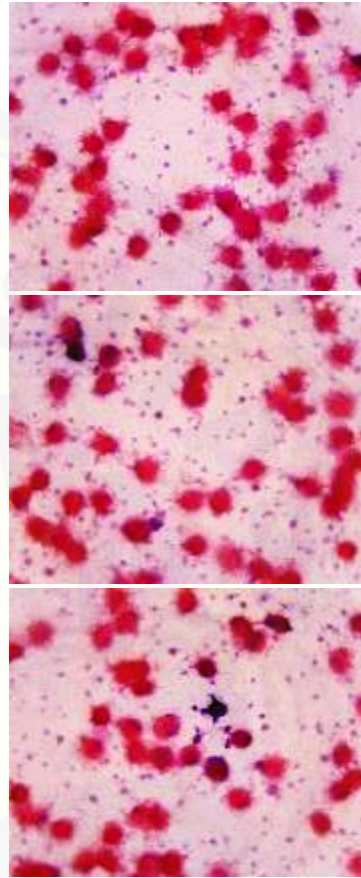
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang hanya diberi fMLP tanpa dipapar antioksidan, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok fMLP inkubasi 1 jam
4Kelompok fMLP inkubasi 18 jam
4

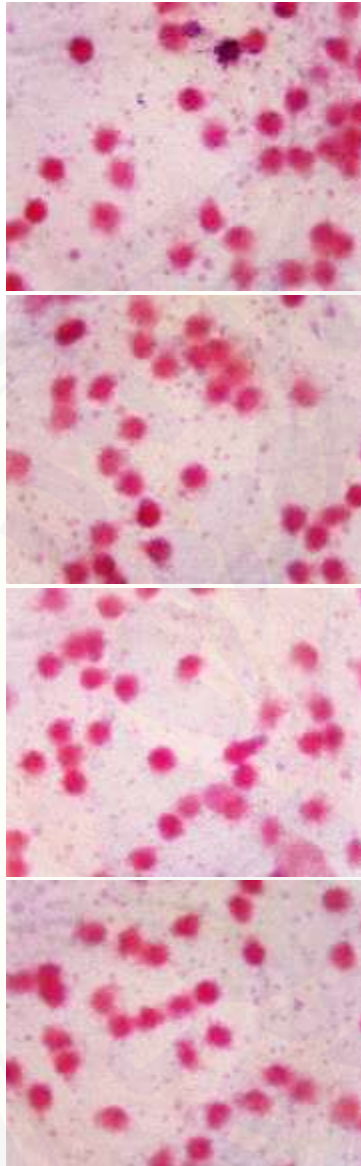
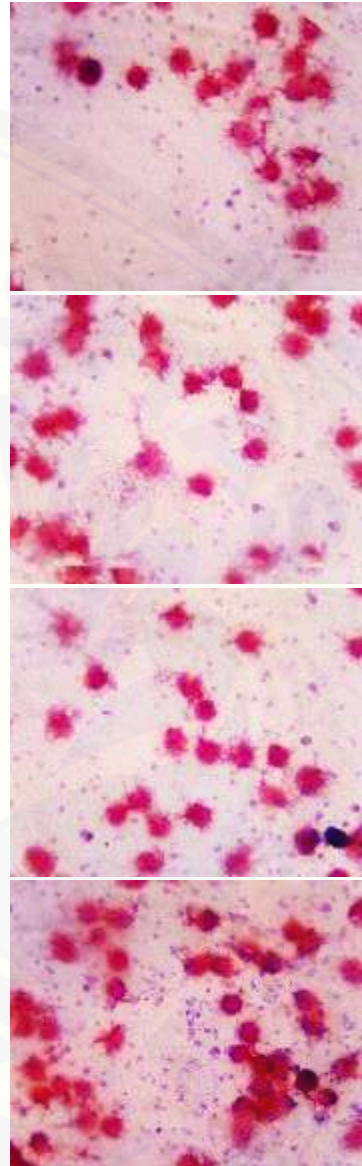
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang hanya diberi fMLP tanpa dipapar antioksidan, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok GSH inkubasi 1 jam
1Kelompok GSH inkubasi 18 jam
1

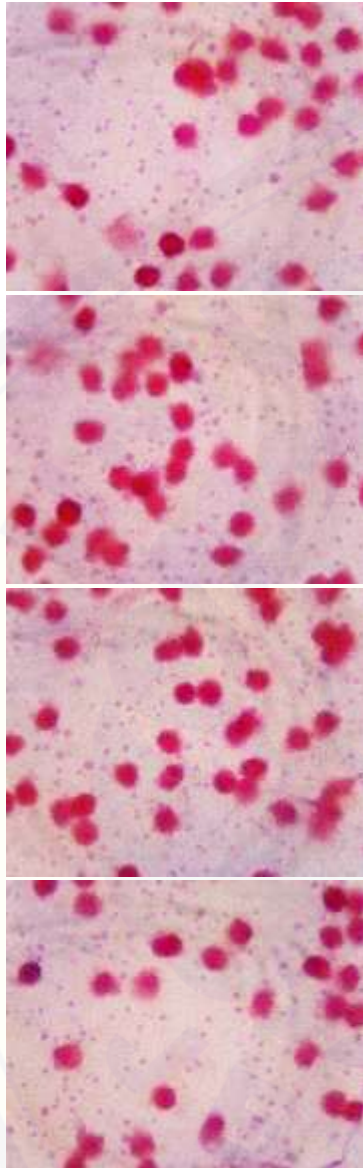
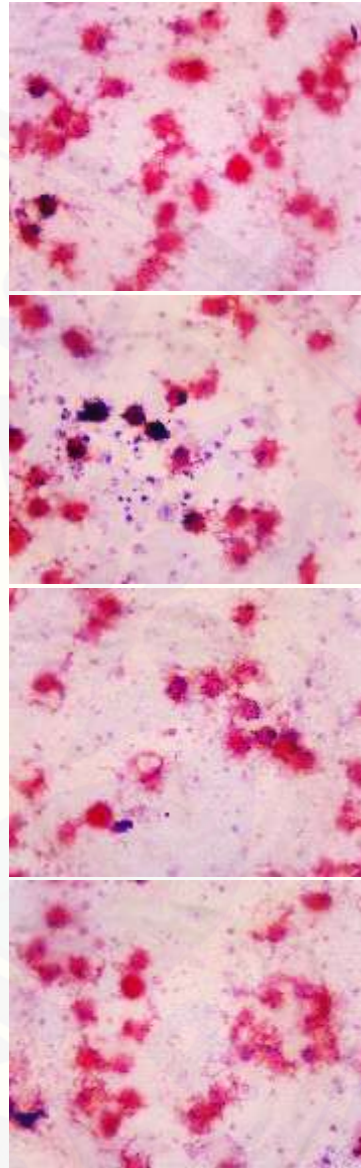
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar GSH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok GSH inkubasi 1 jam
2Kelompok GSH inkubasi 18 jam
2

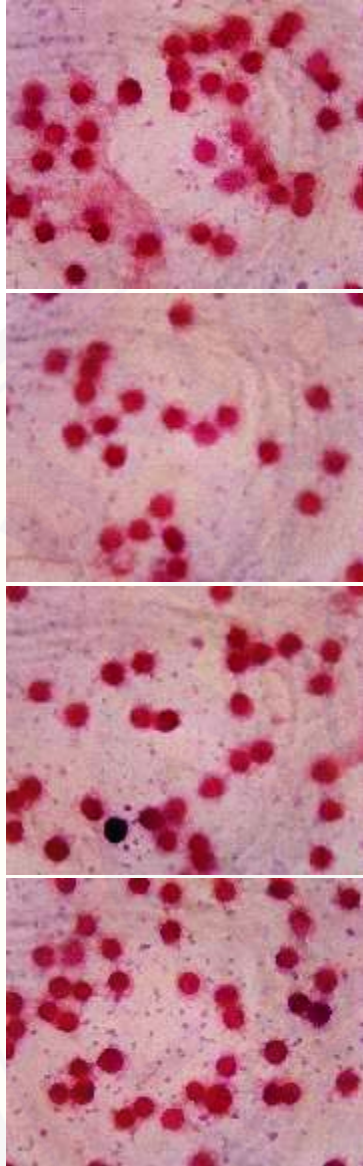
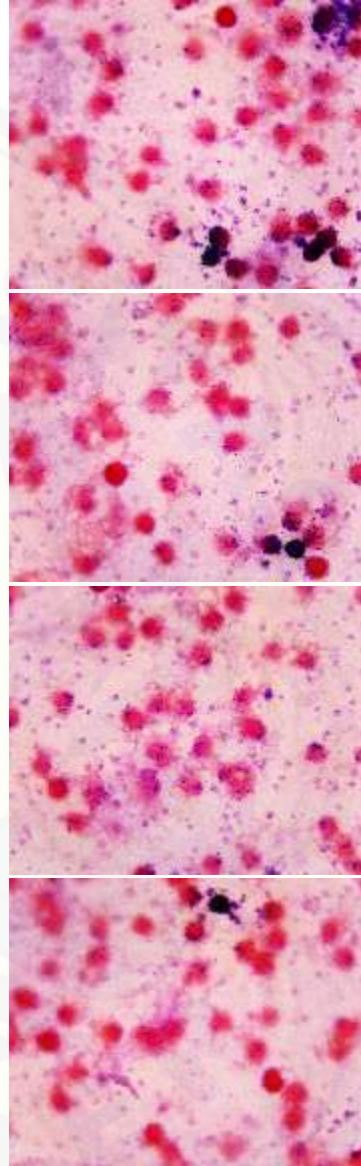
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar GSH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok GSH inkubasi 1 jam
3Kelompok GSH inkubasi 18 jam
3

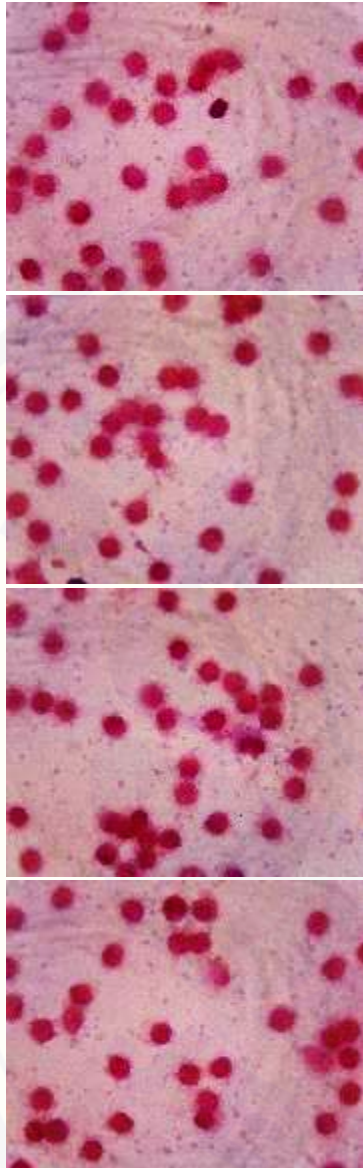
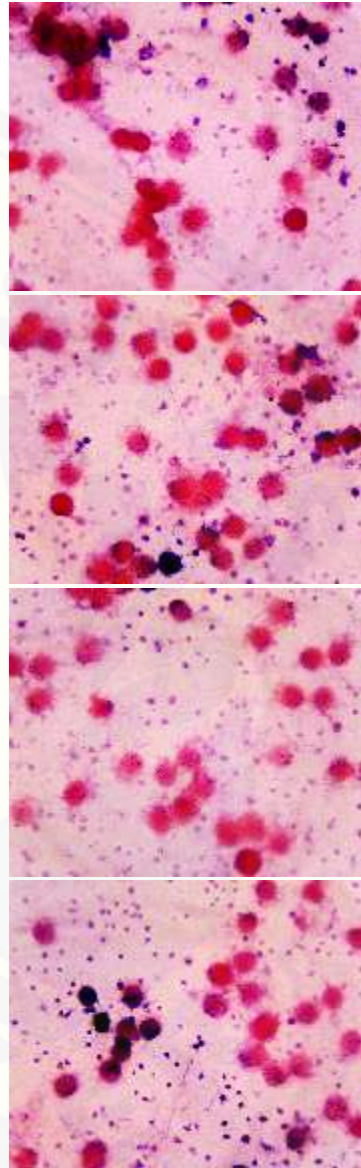
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar GSH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok GSH inkubasi 1 jam
4Kelompok GSH inkubasi 18 jam
4

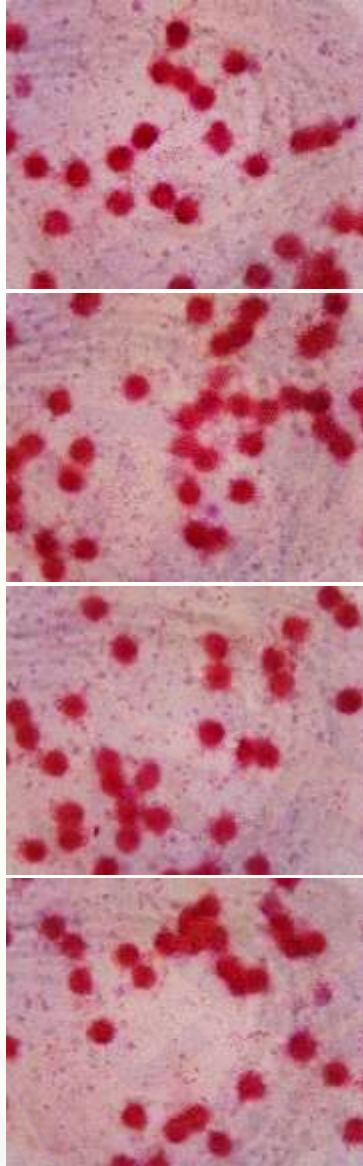
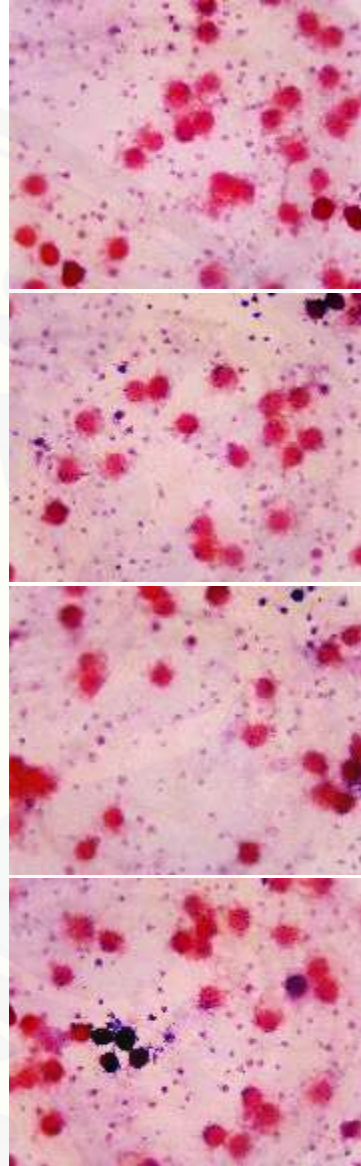
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar GSH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok Gg-PH inkubasi 1 jam
1Kelompok Gg-PH inkubasi 18 jam
1

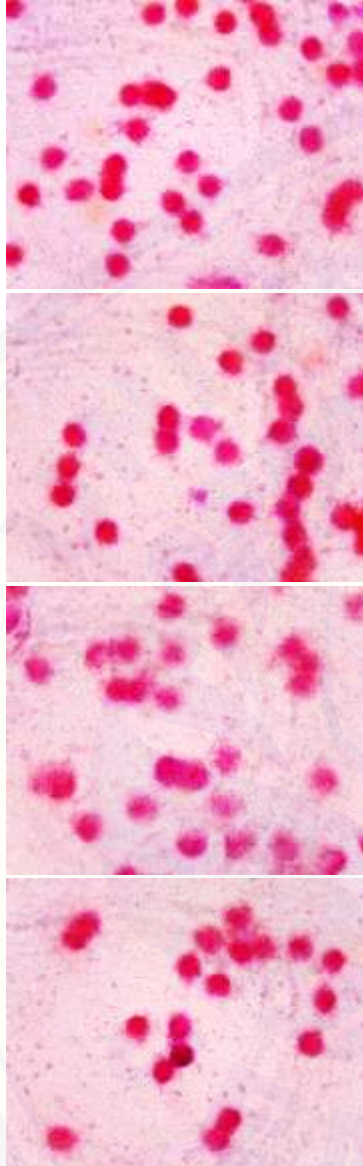
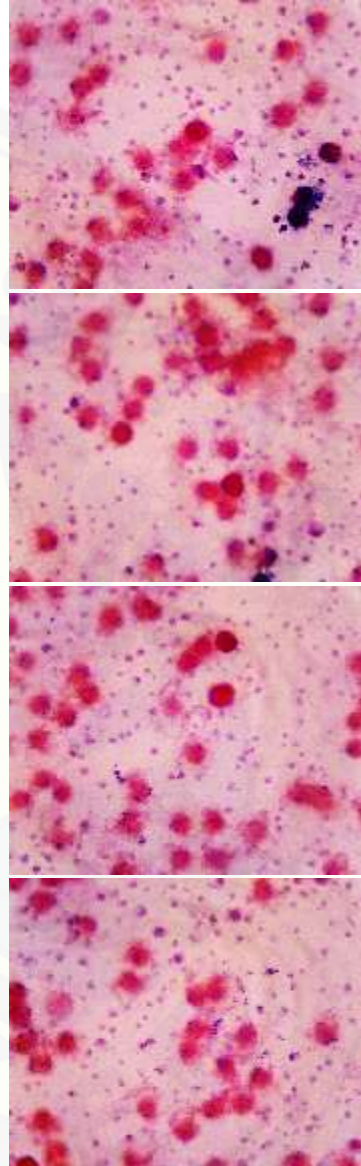
Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar Gg-PH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok Gg-PH inkubasi 1 jam
2Kelompok Gg-PH inkubasi 18 jam
2

Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar Gg-PH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok Gg-PH inkubasi 1 jam
3Kelompok Gg-PH inkubasi 18 jam
3

Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar Gg-PH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Kelompok Gg-PH inkubasi 1 jam
4Kelompok Gg-PH inkubasi 18 jam
4

Gambar mikroskopis kelompok monosit yang dipapar Gg-PH kemudian dipapar fMLP, inkubasi 1 dan 18 jam. Monosit normal berwarna merah, monosit yang memproduksi radikal superoksida memiliki bercak warna biru-ungu.

Lampiran H. Penghitungan monosit yang memproduksi radikal superoksida inkubasi 1 jam dan 18 jam

Penghitungan monosit yang memproduksi radikal superoksida inkubasi 1 jam

Ulangan (Monosit Inkubasi)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	13	8	9	10
2	12	4	6	7.33
3	4	2	4	3.33
4	14	9	10	11
Jumlah				31.67
Rata-rata				7.92
%				7.92%

Ulangan (Monosit + fMLP)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	9	6	8	7.67
2	12	8	10	10
3	16	4	11	10.33
4	20	8	17	15
Jumlah				43.00
Rata-rata				10.75
%				10.75%

Ulangan (Monosit + GSH + fMLP)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	3	1	1	1.67
2	0	0	0	0
3	1	1	1	1
4	0	0	0	0
Jumlah				2.67
Rata-rata				0.67
%				0.67%

Ulangan (Monosit + Gg- PH + fMLP)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	1	1	1	1
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
Jumlah				1.00
Rata-rata				0.25
%				0.25%

Penghitungan monosit yang memproduksi radikal superoksida inkubasi 18 jam

Ulangan (Monosit + fMLP)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	19	18	20	19.00
2	16	12	13	13.67
3	19	16	20	18.33
4	32	17	27	25.33
Jumlah				76.33
Rata-rata				19.08
%				19.08%

Ulangan (Monosit + GSH + fMLP)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	6	6	6	6.00
2	4	5	5	4.67
3	13	4	15	10.67
4	11	11	12	11.33
Jumlah				32.67
Rata-rata				8.17
%				8.17%

Ulangan (Monosit + Gg- PH + fMLP)	Pengamat			Rata-rata
	1	2	3	
1	14	13	15	14.00
2	26	21	26	24.33
3	8	8	8	8.00
4	4	3	5	4.00
Jumlah				50.33
Rata-rata				12.58
%				12.58%

Lampiran I. Hasil absorbansi radikal superoksida ekstra seluler 1 jam dan 18 jam

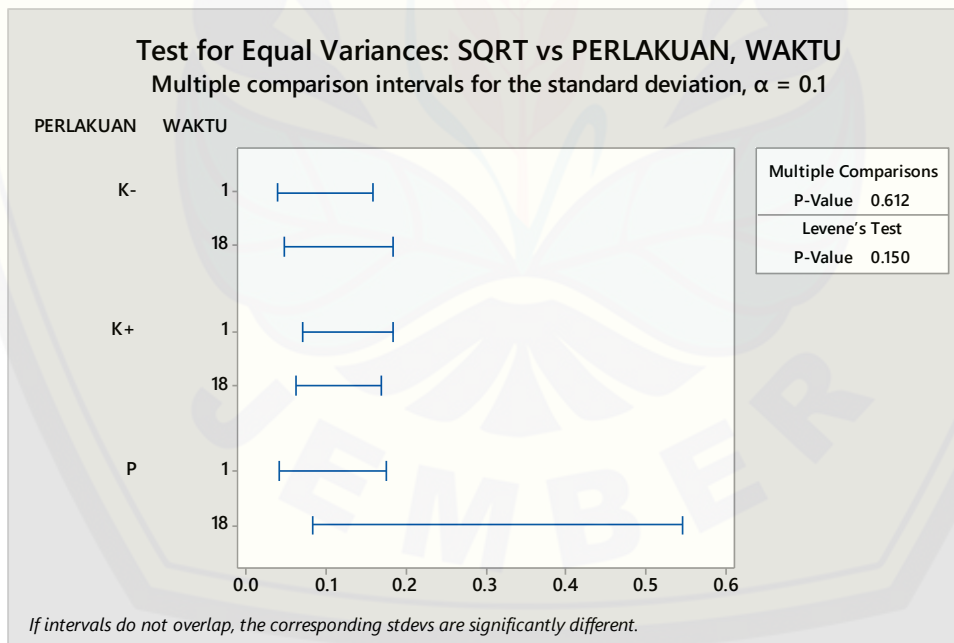
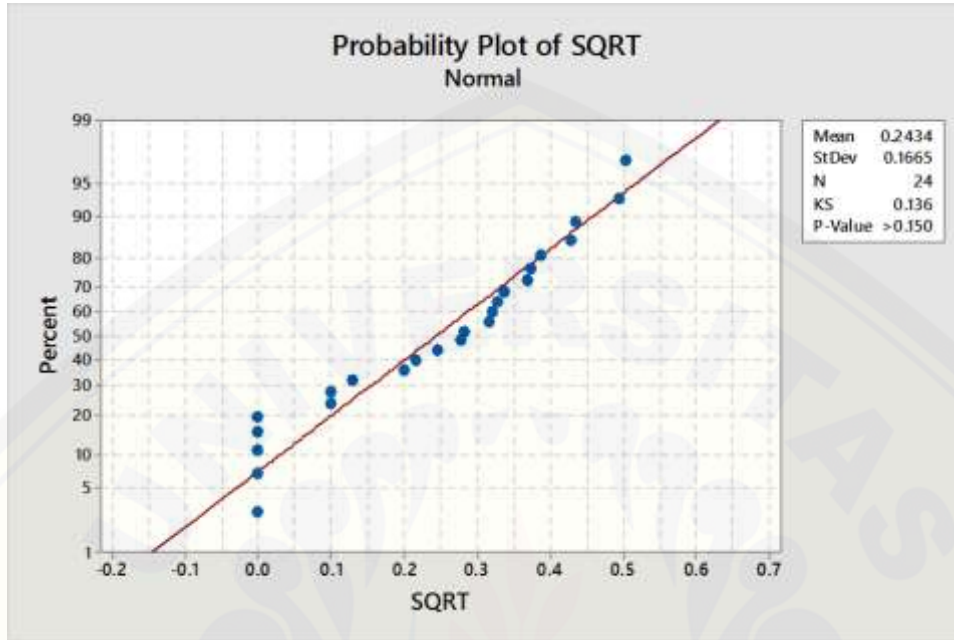
Absorbansi radikal superoksida ekstra seluler 1 jam

	1	2	3	4	Rerata	SD
Monosit + fMLP	0.087	0.082	0.085	0.09	0.086	0.0034
Monosit + GSH + fMLP	0.199	0.206	0.165	0.215	0.196	0.0218
Monosit + Gg-PH + fMLP	0.105	0.1	0.101	0.103	0.102	0.0022

Absorbansi radikal superoksida ekstra seluler 18 jam

	1	2	3	4	Rerata	SD
Monosit + fMLP	0.104	0.112	0.103	0.1	0.1048	0.0051
Monosit + GSH + fMLP	0.26	0.197	0.234	0.166	0.2143	0.0413
Monosit + Gg-PH + fMLP	0.128	0.141	0.162	0.124	0.1388	0.0171

Lampiran J. Analisis data



Test for Equal Variances: SQRT versus PERLAKUAN, WAKTU

Method

Null hypothesis All variances are equal
 Alternative hypothesis At least one variance is different
 Significance level $\alpha = 0.1$

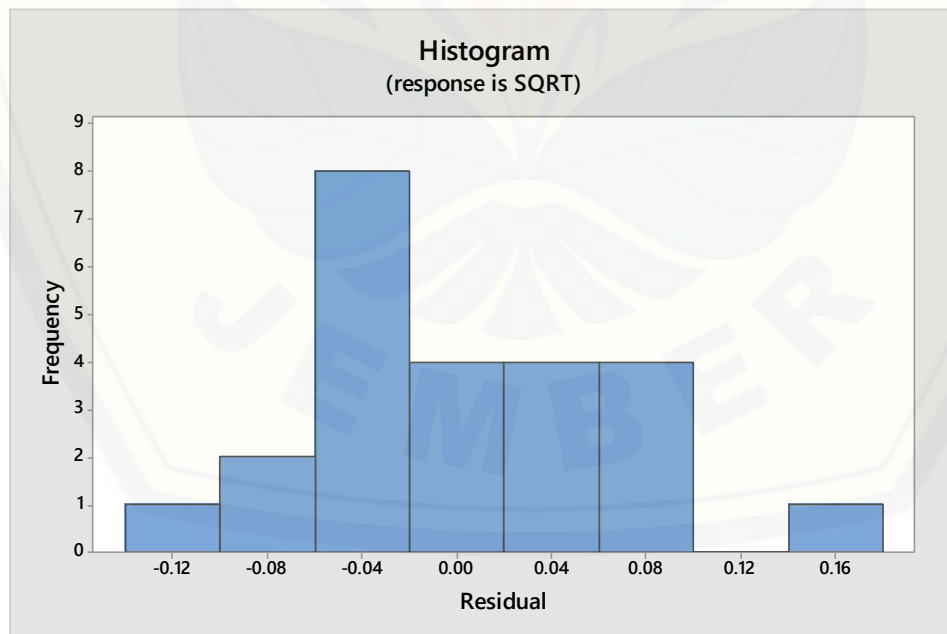
90% Bonferroni Confidence Intervals for Standard Deviations

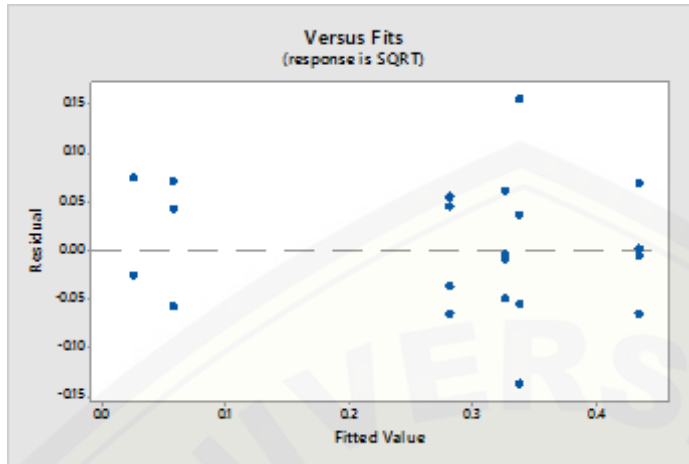
PERLAKUAN	WAKTU	N	StDev	CI
K-	1	4	0.045770	(0.0071976, 0.72489)
K-	18	4	0.054709	(0.0089087, 0.83679)
K+	1	4	0.067194	(0.0212521, 0.52913)
K+	18	4	0.059715	(0.0181013, 0.49064)
P	1	4	0.050000	(0.0065792, 0.94641)
P	18	4	0.125841	(0.0250685, 1.57335)

Individual confidence level = 98.3333%

Tests

Method	Test	
	Statistic	P-Value
Multiple comparisons	-	0.612
Levene	1.87	0.150





ANOVA: SQRT versus PERLAKUAN, WAKTU

Factor	Type	Levels	Values
PERLAKUAN	fixed	3	K-, K+, P
WAKTU	fixed	2	1, 18

Analysis of Variance for SQRT

Source	DF	SS	MS	F	P
PERLAKUAN	2	0.22394	0.11197	21.32	0.000
WAKTU	1	0.27748	0.27748	52.85	0.000
PERLAKUAN*WAKTU	2	0.04175	0.02088	3.98	0.037
Error	18	0.09451	0.00525		
Total	23	0.63769			

S = 0.0724624 R-Sq = 85.18% R-Sq(adj) = 81.06%

Lampiran K. Penghitungan uji lanjutan HSD

$$S\bar{Y} = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

$$HSD = q_{(\alpha;t;dbg)} \times S\bar{Y}$$

$$S\bar{Y} = \sqrt{\frac{0,004055}{4}}$$

$$S\bar{Y} = 0,031839441$$

$$HSD = q_{(0,05;3;18)} \times S\bar{Y}$$

$$HSD = 3,927 \times 0,032839441$$

$$HSD = 0,125033485$$

Keterangan:

KTG : Kuadrat Tengah – Galat

r : banyak ulangan

α : 0,05

t : banyak perlakuan

dbg : derajat bebas – galat

q : tabel HSD

Diketahui:

KTG : 0,004055

r : 4

α : 0,05

t : 3

dbg : 18

Hasil uji HSD produksi radikal superoksida intra seluler antar kelompok perlakuan inkubasi 1 jam dan 18 jam

Kelompok	Jumlah monosit yang memproduksi radikal superoksida		HSD ($\alpha=0,05$)
	$ \mu_1 - \mu_2 $ Inkubasi 1 jam	$ \mu_1 - \mu_2 $ Inkubasi 18 jam	
Monosit + antigen fMLP	10,75 ^{b,c}	19,08 ^{b,c}	
Monosit + antioksidan GSH + antigen fMLP	0,67 ^{a,c}	8,17 ^{a,c}	0,125
Monosit + protein antioksidan Gg-PH + antigen fMLP	0,25 ^{a,c}	12,58 ^{a,b,c}	

$|\mu_1 - \mu_2| > HSD (0,125)$ beda nyata

a: beda nyata dengan kontrol negatif (kelompok monosit + fMLP)

b: beda nyata dengan kontrol positif (kelompok monosit + GSH + fMLP)

c: beda nyata antar kelompok inkubasi 1 dan 18 jam

Lampiran L. Alat dan Bahan



Blender



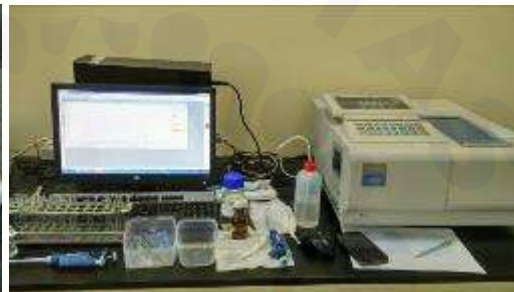
Sentrifuse



Water-bath



Dry block



Spektrofotometri uv-vis



Laminar flow



*Mikroskop
Inverted*



*Incubator
shaker*



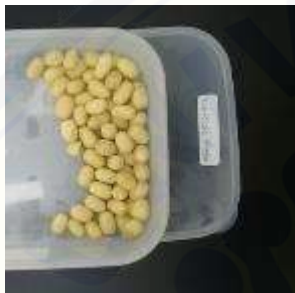
Microplate reader



Sentrifuse



Tabung heparin, vacuntainer dan torniquet



Biji Melinjo



Aquabidest



GSH



LSM



*Ficoll
hypaque
1.119*



HBSS



NBT



*Fungizone & Penicillin-
Streptomycin*



Darah vena
perifer



fMLP