



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KEMAMPUAN PROTEKSI
TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI PROTEIN ISOLAT
BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) TERHIDROLISIS
MENGUNAKAN ALKALASE TERIMOBILISASI**

SKRIPSI

Oleh

Anandini Aulia Safiera

NIM 122210101093

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2016



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KEMAMPUAN PROTEKSI
TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI PROTEIN ISOLAT
BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) TERHIDROLISIS
MENGUNAKAN ALKALASE TERIMOBILISASI**

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Ilmu Farmasi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh

Anandini Aulia Safiera

NIM 122210101093

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2016

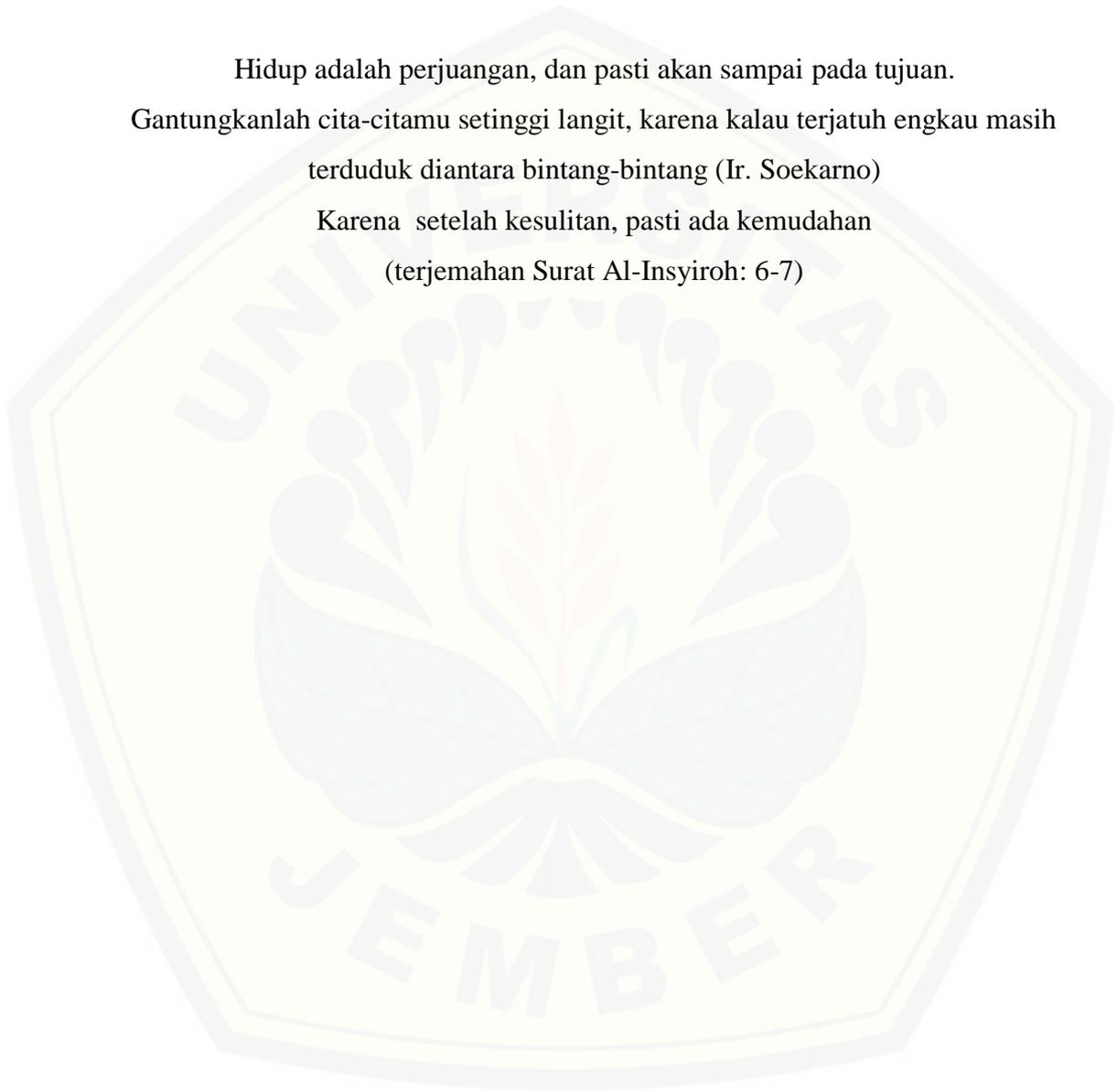
PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Slamet Hariyadi dan Ibunda Heni Resmita Retno. Adik saya Anansadino Farhan Lazuardi serta seluruh keluarga besar;
2. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama, Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D. selaku dosen pembimbing;
3. Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., Apt., M.Farm. dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.sc., Ph.D. selaku dosen penguji;
4. Bapak dan ibu guru TK Dharma Indria II, SDN Jember Lor III, SDN Kepatihan II Banyuwangi, MTs Al-Kautsar Banyuwangi, Pondok Pesantren Putri Modern Al-Kautsar Banyuwangi, dan MAN 1 Jember;
5. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTO

Hidup adalah perjuangan, dan pasti akan sampai pada tujuan.
Gantungkanlah cita-citamu setinggi langit, karena kalau terjatuh engkau masih
terduduk diantara bintang-bintang (Ir. Soekarno)
Karena setelah kesulitan, pasti ada kemudahan
(terjemahan Surat Al-Insyiroh: 6-7)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anandini Aulia Safiera

NIM : 122210101093

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “*Aktivitas Antioksidan dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) Terhidrolisis Menggunakan Alkalase Terimobilisasi*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan isinya sesuai dengan prinsip 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 dikemudian hari pernyataan tidak benar.

Jember, 18 Oktober 2016

Yang menyatakan,

Anandini Aulia Safiera

NIM 122210101093

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN KEMAMPUAN PROTEKSI
TERHADAP KERUSAKAN DNA DARI PROTEIN ISOLAT
BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) TERHIDROLISIS
MENGUNAKAN ALKALASE TERIMOBILISASI**

Oleh

Anandini Aulia Safiera
NIM 122210101093

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “*Aktivitas Antioksidan dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) Terhidrolisis Menggunakan Alkalase Terimobilisasi*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 18 Oktober 2016

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP. 198107232006042002

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

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Indah Yulia Ningsih, S.Farm., Apt., M.Farm.
NIP. 198407122008122002

Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.sc., Ph.D.
NIP. 196902011994031002

Mengesahkan
Dekan Fakultas Farmasi,
Universitas Jember

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm.
NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) Terhidrolisis Menggunakan Alkalase Terimobilisasi; Anandini Aulia Safiera, 122210101093; 2016; 80 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyakit degeneratif menjadi permasalahan besar bagi tiap negara dan sampai saat ini telah menjadi penyebab kematian terbanyak di dunia. Salah satu faktor penyebab yang berhubungan erat dengan penyakit tersebut antara lain paparan radikal bebas. Radikal bebas terpenting yang terdapat di dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut dengan kelompok oksigen reaktif (ROS). Salah satu ROS yang paling reaktif dan toksik dibandingkan dengan kelompok radikal lain serta berperan besar dalam kerusakan DNA melalui reaksi fenton adalah radikal hidroksil. Pencegahan akibat radikal bebas ini dapat diatasi dengan senyawa antioksidan yang berasal dari tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.).

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase bebas memiliki potensi antioksidan. Namun alkalase bebas tersebut hanya dapat digunakan dalam sekali perlakuan. Perlu adanya solusi untuk penggunaan alkalase yang dapat digunakan secara berulang, yaitu dengan cara teknik imobilisasi enzim. Sehubungan dengan hal tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo sebagai antioksidan, dalam hal ini uji peredaman radikal hidroksil dan proteksi terhadap kerusakan DNA. Efektivitas enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo dapat dilihat berdasarkan karakterisasi imobilisasi enzim pada FTIR dan SEM serta nilai derajat hidrolisis (%), sedangkan keberhasilan proses hidrolisis dapat dilihat melalui hasil SDS-PAGE. Uji aktivitas antioksidan ditentukan dengan melihat kemampuan dalam menghambat radikal hidroksil (%) dan proteksi terhadap kerusakan DNA dalam gel agarosa 1%. Data yang diperoleh berupa peredaman radikal hidroksil (%) dan nilai IC₅₀, hasil uji

One Way ANOVA dan *post hoc* LSD serta hasil elektroforesis gel agarosa yang dilihat melalui *UV transilluminator*.

Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa protein isolat biji melinjo telah berhasil dihidrolisis menggunakan enzim alkalase terimobilisasi ditandai dengan nilai derajat hidrolisis sebesar 70,33% dan profil pita protein yang memudar berdasarkan perubahan berat molekul yang semakin kecil. Uji peredaman radikal hidroksil diperoleh dari nilai IC_{50} Gg-PK, Gg-PH terimobilisasi, Gg-PH bebas, dan GSH secara berturut-turut sebesar $0,3376 \pm 0,0258 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0,0020 \pm 0,0005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $0,0008 \pm 0,0003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan $0,0003 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Semakin kecil nilai IC_{50} yang diperoleh, maka semakin besar aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal hidroksil. Hasil analisis LSD menunjukkan bahwa sampel Gg-PH terimobilisasi memiliki aktivitas antioksidan lebih bagus dibandingkan Gg-PK. Sedangkan kelompok sampel Gg-PH terimobilisasi tidak berbeda signifikan terhadap sampel Gg-PH bebas dan GSH. Protein yang dihidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi juga memiliki kemampuan dalam proteksi kerusakan DNA yang ditandai dengan perubahan kembali bentuk pita *supercoil* akibat paparan radikal hidroksil.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah protein biji melinjo (Gg-PH) terhidrolisis menggunakan alkase terimobilisasi memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dalam meredam radikal hidroksil dibandingkan protein kasar dan protein isolat, serta mampu memproteksi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil dengan perbandingan 1:20 (plasmid DNA : protein).

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhidrolisis Menggunakan Alkalase Terimobilisasi”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

1. Allah SWT yang telah memberikan kemudahan dalam penyelesaian skripsi ini melalui anugerah, petunjuk dan hidayah-Nya serta Nabi Muhammad SAW sebagai penuntun dalam hidup;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Lidya Ameliana, S.Si., Apt., M.Farm. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama studi;
4. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama, Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D. selaku dosen pembimbing anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian serta dengan sabar membimbing penulis dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
5. Ibu Indah Yulia Ningsih, S.Farm., Apt., M.Farm. dan Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.sc., Ph.D. selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dalam penulisan skripsi ini;
6. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu dan berbagi pengalaman selama masa perkuliahan;
7. Seluruh staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;

8. Ayahanda Slamet Hariyadi dan Ibunda Heni Resmita Retno yang telah mendidik, menyayangi, dan mendoakan saya. Adik saya Anansadino Farhan Lazuardi serta seluruh keluarga besar yang turut mendoakan serta memberikan semangat;
9. Sahabat-sahabat saya Aik, Amelya, Ayu, Citra, Dessy, Firoh, Galuh, Hidayah, Nili, Nunung, Novia Hilma, Mia, Shasa, Riyah, Vinastika yang telah memberikan dorongan, doa dan semangat;
10. Seluruh pihak Laboratorium CDAST yang terkait atas bantuan yang sangat luar biasa selama penelitian;
11. Keluarga besar Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM), UKKI Asy-Syifa' dan UKM Karisma atas semua pengalaman dan kebersamaannya;
12. Teman-teman seperjuangan "Petruk Rolas" Fakultas Farmasi Universitas Jember;
13. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan, semoga kebaikan dan dukungan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Allah SWT. Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 18 Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR PERSAMAAN.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Penyakit Degeneratif	4
2.2 Radikal Bebas	5
2.3 Kerusakan DNA	8
2.4 Antioksidan	12
2.5 Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	13
2.6 Protein	15
2.6.1 Isolasi Protein	16

2.6.2	Hidrolisis Protein	18
2.6.3	Analisis Kuantitatif Protein	19
2.6.4	Elektroforesis	20
2.7	Imobilisasi Enzim	21
2.8	Penentuan Aktivitas Antioksidan Melalui Peredaman Radikal Hidroksil	23
BAB 3	METODE PENELITIAN	26
3.1	Jenis Penelitian	26
3.2	Sampel Penelitian	26
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.4	Alat dan Bahan Penelitian	26
3.4.1	Alat	26
3.4.2	Bahan	27
3.5	Rancangan Penelitian	27
3.6	Variabel Penelitian	28
3.6.1	Variabel Bebas	28
3.6.2	Variabel Terikat	28
3.6.3	Variabel Terkendali	28
3.7	Definisi Operasional	28
3.8	Prosedur Penelitian	29
3.8.1	Preparasi Imobilisasi Enzim Alkalase	29
3.8.2	Ekstraksi Biji Melinjo	29
3.8.3	Isolasi Protein Biji Melinjo	29
3.8.4	Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo	30
3.8.5	Pengukuran Total Protein	30
3.8.6	Pengukuran Derajat Hidrolisis	31
3.8.7	Elektroforesis SDS-PAGE	31
3.8.8	Pengujian Peredaman Radikal Hidroksil	32
3.8.9	Kultur dan Isolasi Plasmid DNA	32
3.8.10	Elektroforesis Gel Agarosa 1%	33
3.9	Analisis Data	34

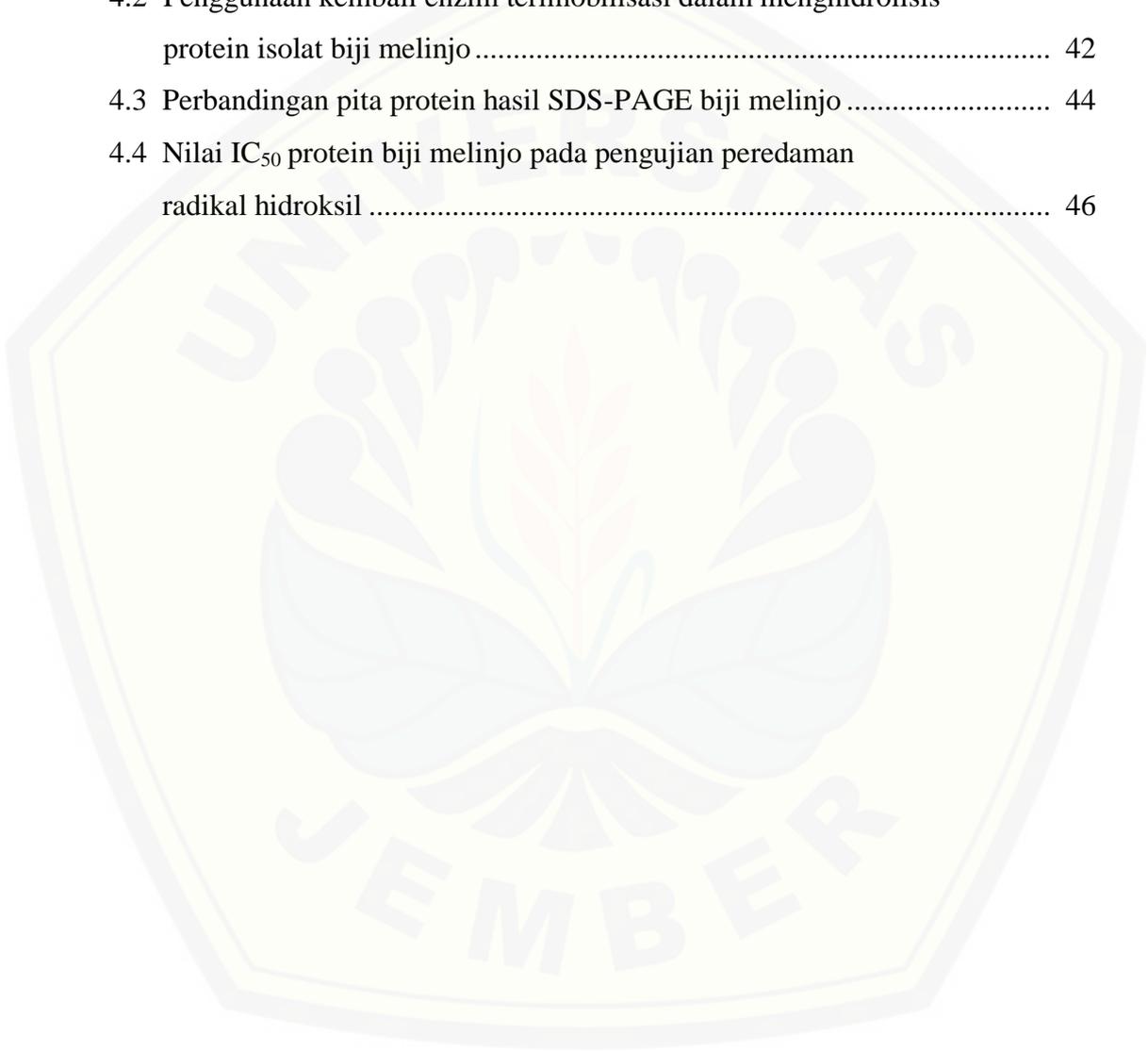
3.10 Skema Penelitian	36
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Karakterisasi Imobilisasi Enzim Alkalase	37
4.2 Ekstraksi dan Isolasi Biji Melinjo.....	39
4.3 Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo dan Penentuan Derajat Hidrolisis	40
4.4 Pola Pita Protein	42
4.5 Aktivitas Antioksidan Protein Terhidrolisis pada Peredaman Radikal Hidroksil	44
4.6 Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo Terhidrolisis	46
BAB 5. PENUTUP	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Proses reduksi pada oksigen yang menghasilkan superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil	7
2.2 Reaksi pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi fenton dan haber-weiss	7
2.3 Cedera sel yang diakibatkan oleh radikal bebas	8
2.4 Konformasi plasmid DNA	9
2.5 Elektroforesis gel agarosa	10
2.6 Melinjo (<i>Gnetum Gnemon L.</i>)	14
2.7 Struktur umum protein	15
2.8 Elektroforesis gel poliakrilamid	20
2.9 Metode imobilisasi enzim	23
2.10 Reaksi pembentukan ikatan MDA-TBA akibat radikal hidroksil	24
3.1 Rancangan penelitian secara skematik	27
3.2 Skema penelitian	36
4.1 Fotogram SEM dengan perbesaran 3.000 kali	37
4.2 Spektra FTIR matriks dan enzim alkalase terimobilisasi	38
4.3 Enzim alkalase terimobilisasi	39
4.4 Elektrofoteris SDS-PAGE	43
4.5 Profil aktivitas antioksidan pada peredaman radikal hidroksil protein biji melinjo.....	45
4.6 Optimasi waktu inkubasi pada DNA plasmid	48
4.7 Efek proteksi protein biji melinjo terhidrolisis pada DNA plasmid.	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Hasil produksi bertahap protein biji melinjo.....	40
4.2 Penggunaan kembali enzim terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo	42
4.3 Perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE biji melinjo	44
4.4 Nilai IC ₅₀ protein biji melinjo pada pengujian peredaman radikal hidroksil	46

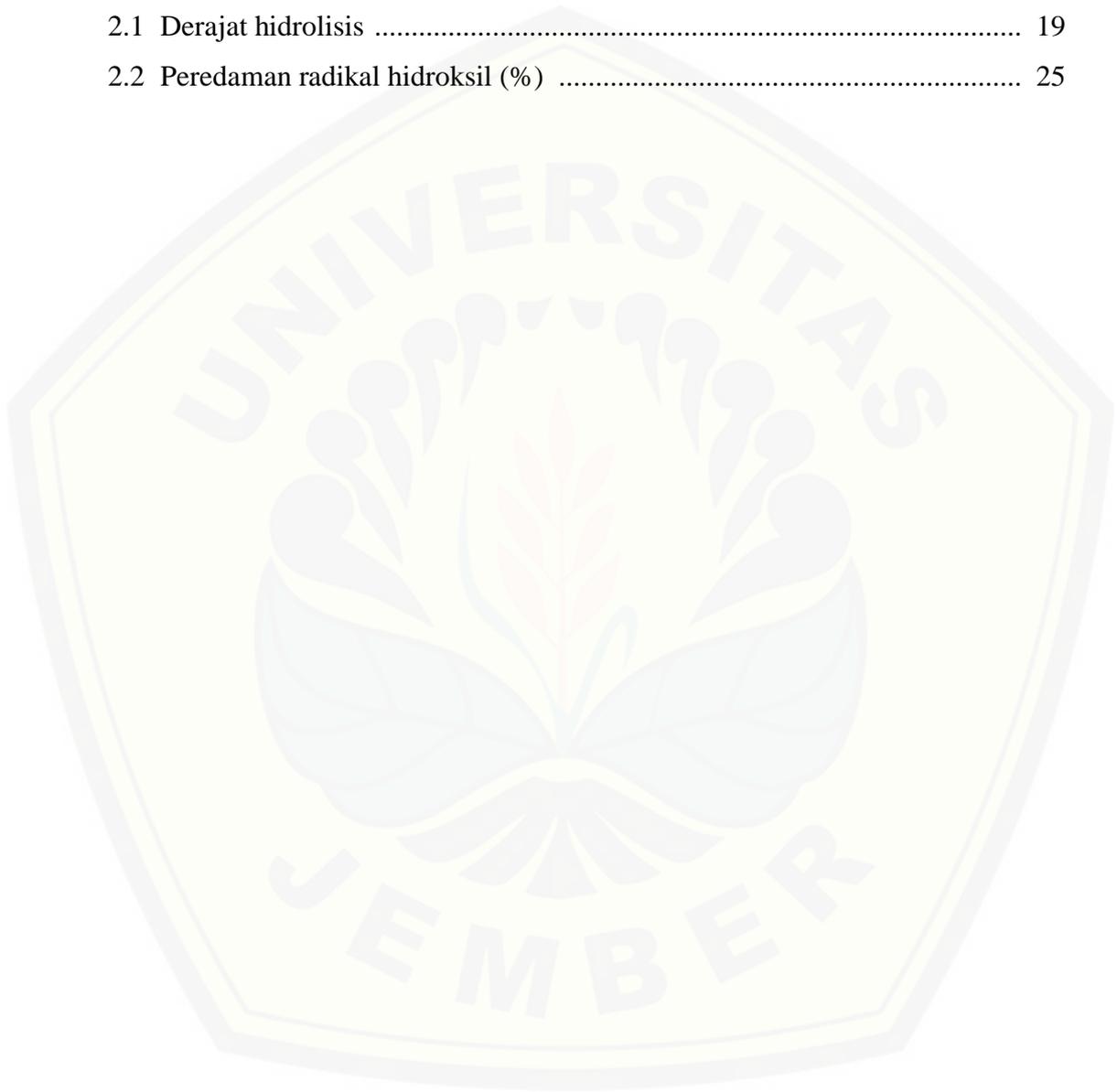


DAFTAR LAMPIRAN

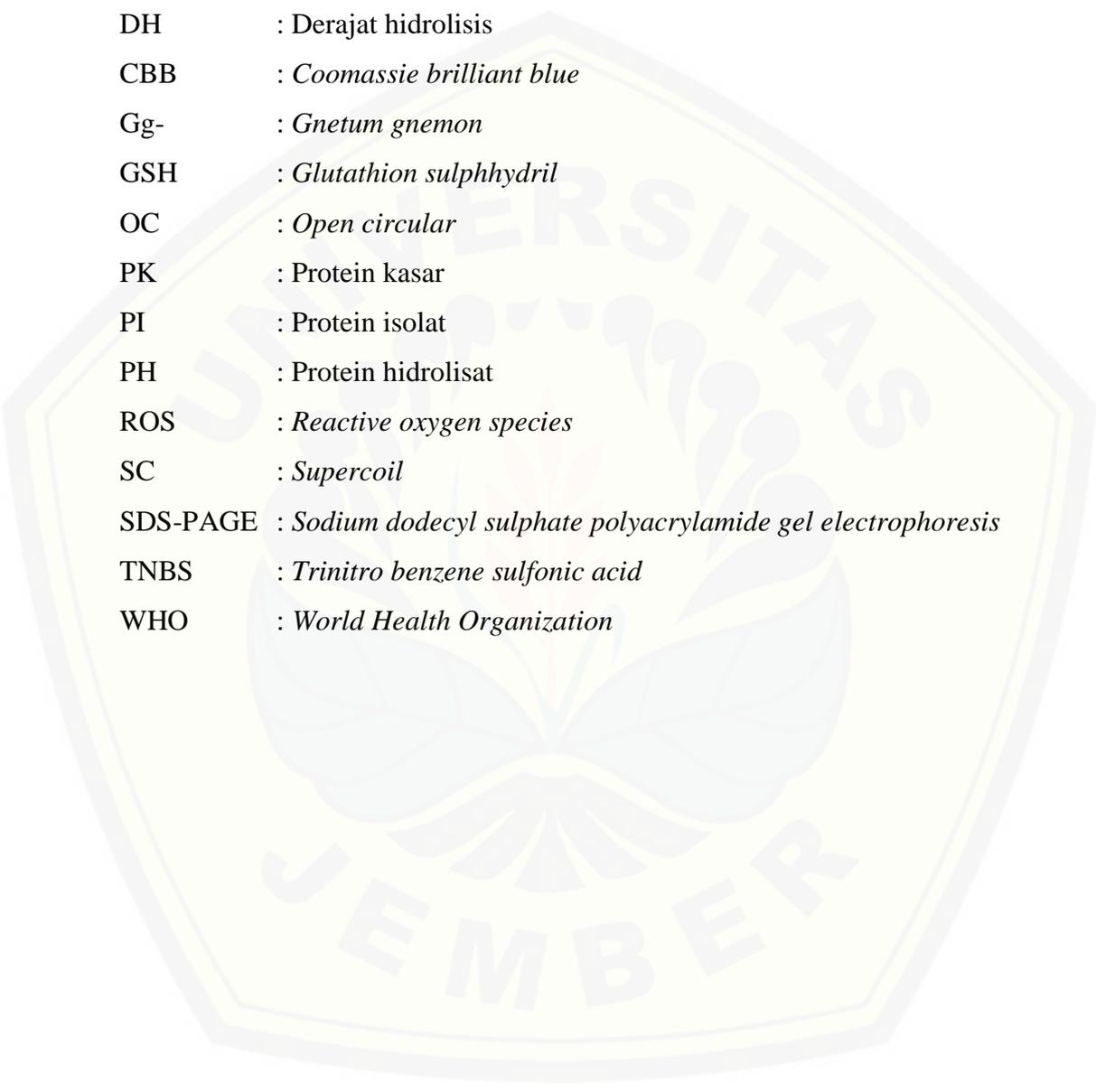
	Halaman
A. Komposisi bahan yang digunakan	60
B. Perhitungan kandungan protein biji melinjo	63
C. Perhitungan derajat hidrolisis	65
D. Perhitungan peredaman radikal hidroksil	68
E. Perhitungan nilai IC_{50} dan analisis data statistik	69
F. Nilai IC_{50} Gg-PK, Gg-PH (terimobilisasi), Gg-PH (bebas) dan GSH	77
G. Pengukuran berat molekul protein	78
H. Perhitungan plasmid DNA	80

DAFTAR PERSAMAAN

2.1 Derajat hidrolisis	19
2.2 Peredaman radikal hidroksil (%)	25



DAFTAR SINGKATAN



DH	: Derajat hidrolisis
CBB	: <i>Coomassie brilliant blue</i>
Gg-	: <i>Gnetum gnemon</i>
GSH	: <i>Glutathion sulphhydril</i>
OC	: <i>Open circular</i>
PK	: Protein kasar
PI	: Protein isolat
PH	: Protein hidrolisat
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
SC	: <i>Supercoil</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TNBS	: <i>Trinitro benzene sulfonic acid</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Penyakit degeneratif telah menjadi penyebab kematian terbesar di dunia hingga saat ini. Menurut WHO, hampir 17 juta orang meninggal lebih awal tiap tahunnya akibat epidemi global penyakit degeneratif. Fakta yang beredar, bahwa penyakit degeneratif ditemukan lebih buruk di beberapa negara dengan pendapatan nasional sedang dan rendah (82%). Data WHO menunjukkan bahwa dari 57 juta kematian yang terjadi di seluruh dunia, sebanyak 36 juta atau hampir dua pertiganya disebabkan oleh penyakit degeneratif, terutama penyakit kardiovaskular, kanker, penyakit pernapasan kronis, dan diabetes melitus. Menurut riset kesehatan dasar (Riskesdas) (2007), penyebab kematian utama yang memiliki peringkat terbesar di Indonesia (59,9%) yaitu penyakit degeneratif atau penyakit tidak menular (PTM).

Hal ini tidak terlepas dari perubahan pola hidup dan makin tingginya usia harapan hidup masyarakat. Peningkatan penyakit degeneratif ini disebabkan karena gaya hidup yang tidak sehat, seperti merokok, pola makan yang tidak seimbang, rendahnya asupan buah dan sayur, dan rendahnya aktivitas fisik (Indrawati *et al.*, 2009). Kesalahan pola makan dan gaya hidup yang tidak sehat ini dapat mengaktifkan radikal bebas yang dapat merusak tubuh. Apabila radikal bebas ini berikatan dengan asam lemak tak jenuh, dapat menyebabkan awal mula dari kerusakan sel dan akan menimbulkan gangguan terhadap molekul DNA yang berakibat pada terbentuknya mutasi basa-basa nitrogen serta berakhir dengan karsinogenesis (Handjani *et al.*, 2009).

Radikal bebas yang terbentuk itu berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas ini memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron molekul sekitarnya. Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah dan menyerang tubuh (Kalt *et al.*, 1999). Radikal

bebas terpenting di dalam tubuh adalah *reactive oxygen species* (ROS), yang merupakan senyawa pengoksidasian turunan oksigen dan bersifat sangat reaktif (Halliwell & Whiteman, 2004). Salah satu jenis ROS adalah radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) (Marks *et al.*, 2000). Radikal hidroksil merupakan senyawa radikal yang paling berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil dapat merusak salah satu senyawa yang paling penting untuk mempertahankan integritas sel yaitu DNA (Halliwell & Gutteridge, 1999). Radikal hidroksil merupakan spesies oksigen reaktif yang paling poten dan menjadi inisiator reaksi berantai, menyebabkan pemutusan untai serta perubahan basa DNA (Marks *et al.*, 2000). Reaksi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas ini dapat dihentikan dengan antioksidan (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan di Indonesia. Hampir seluruh bagian tanaman melinjo, mulai dari daun, bunga, buah atau biji sampai batangnya dapat digunakan untuk keperluan rumah tangga maupun industri (Sunarto, 1991). Bagian paling penting dari tanaman melinjo yaitu bijinya (Tampubolon, 2013). Namun konsumsi biji melinjo berlebih dapat meningkatkan kadar asam urat (hiperurisemia) yang berbahaya bagi tubuh. Di sisi lain, biji melinjo juga memiliki kandungan protein yang tinggi (9-10%). Protein ini memiliki aktivitas antioksidan alami (Siswoyo *et al.*, 2007).

Pada penelitian yang dilakukan Sembodo (2015) menjelaskan bahwa protein biji melinjo yang telah terhidrolisis memiliki peredaman radikal hidroksil dan kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA lebih tinggi daripada protein biji melinjo yang tidak terhidrolisis. Hidrolisis protein biji melinjo dilakukan dengan cara enzimatik, yaitu hidrolisis yang menggunakan satu jenis enzim atau beberapa enzim yang berbeda (Sediaoetama, 2010). Menurut Siswoyo *et al.* (2013), salah satu enzim yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan yaitu enzim alkalase. Tetapi enzim alkalase ini hanya dapat digunakan satu kali dalam penelitian. Sementara enzim alkalase sangat mahal. Jadi, cara untuk mengatasi hal tersebut yaitu dengan teknik imobilisasi. Teknik imobilisasi ini menghasilkan enzim yang dapat digunakan secara berulang-ulang dan dapat menekan biaya (Bintang, 2010). Namun, sejauh ini belum diketahui efek teknik imobilisasi tersebut terhadap

aktivitas produk hidrolisat yang dihasilkan. Oleh karena itu, penelitian ini ditujukan untuk mengetahui bagaimana efektivitas imobilisasi enzim dalam aktivitas antioksidan. Dalam hal ini adalah peredaman radikal hidroksil dan juga kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- a. Bagaimana kemampuan peredaman radikal hidroksil dari protein biji melinjo (protein kasar, protein isolat, dan protein hidrolisat) sebagai aktivitas antioksidan menggunakan alkalase terimobilisasi?
- b. Bagaimana kemampuan proteksi protein isolat biji melinjo terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi terhadap kerusakan DNA?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui kemampuan peredaman radikal hidroksil dari protein biji melinjo (protein kasar, protein isolat, dan protein hidrolisat) sebagai aktivitas antioksidan menggunakan alkase terimobilisasi.
- b. Mengetahui kemampuan proteksi protein isolat biji melinjo terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi terhadap kerusakan DNA.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

Untuk mengetahui kemampuan protein isolat terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi pada biji melinjo dalam menghambat kerusakan DNA plasmid dengan cara meredam radikal hidroksil dan sebagai bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Degeneratif

Penyakit degeneratif adalah penyakit tidak menular yang berlangsung lama atau kronis karena penurunan fungsi organ di dalam tubuh (Handjani *et al.*, 2009). Penyakit degeneratif ini sudah lama telah menjadi permasalahan tersendiri bagi tiap negara dan sampai saat ini telah menjadi penyebab kematian terbesar di dunia. Data WHO menunjukkan bahwa dari 57 juta kematian yang terjadi di seluruh dunia, sebanyak 36 juta atau hampir dua pertiganya disebabkan oleh penyakit degeneratif terutama pada penyakit kardiovaskular (46,2%), kanker (21,7%), pernapasan kronis (10,7%), dan diabetes melitus (4%). Menurut Kementerian Kesehatan RI (2012), kematian akibat penyakit degeneratif diperkirakan meningkat di seluruh dunia. Peningkatan terbesar akan terjadi di negara-negara menengah dan miskin. Jumlah total kematian akibat penyakit tidak menular diperkirakan meningkat menjadi 52 juta pada tahun 2030.

Di Indonesia, penyakit tidak menular menunjukkan adanya kecenderungan yang semakin meningkat dari waktu ke waktu. Menurut hasil Riskesdas tahun 2007, kematian akibat penyakit degeneratif yang semakin meningkat dengan proporsi 41,7% menjadi 59,5%, sedangkan kematian karena penyakit menular semakin menurun dengan proporsi 44,2% menjadi 28,1%.

Adapun beberapa teori yang menunjukkan proses awal terjadinya penyakit degeneratif di dalam tubuh manusia, yaitu (Handjani *et al.*, 2009):

a. Adanya hubungan antara transisi demografi, epidemiologi, dan kesehatan

Pada tahap ini terjadi seleksi terhadap umur dalam bertahan hidup. Selanjutnya adalah saat dimana fertilitas mulai menurun dan struktur umur mulai berubah dengan meningkatnya umur lansia. Disusul dengan angka kematian dan kelahiran rendah yang menunjukkan bahwa penyakit degeneratif ini menjadi dominan dalam profil kesehatan penduduk.

- b. Perubahan metabolisme tubuh yang ditandai penurunan produksi hormon testosteron untuk laki-laki dan estrogen untuk perempuan biasanya mulai tampak pada usia 65 tahun ke atas

Kedua hormon ini tidak hanya berperan dalam pengaturan seks, tetapi juga dalam proses metabolisme tubuh. Salah satu fungsi dari kedua hormon tersebut yaitu mendistribusikan lemak ke seluruh tubuh. Sehingga, apabila terjadi penurunan produksi kedua hormon tersebut dapat menyebabkan penumpukan lemak yang memicu timbulnya penyakit degeneratif seperti kolesterol dan gula darah yang tinggi.

- c. Pergeseran pola makan dan pola hidup

Disini terjadi pergeseran dari pola makan tradisional yang tinggi karbohidrat, tinggi serat, dan rendah lemak ke pola makan modern yang tinggi lemak, tapi rendah serat dan karbohidrat. Kurangnya mengonsumsi buah-buahan dan sayur-sayuran membuat tubuh kekurangan serat dan dapat berisiko meningkatkan kadar kolesterol tubuh. Bila kondisi ini tidak segera diperbaiki dengan pola makan yang benar dan baik, maka dapat berakibat timbulnya berbagai penyakit, terutama penyakit degeneratif (jantung, diabetes, bahkan kanker kolon).

- d. Paparan radikal bebas

Kesalahan pola makan dan gaya hidup yang dapat merangsang timbulnya radikal bebas (*free radical*) yang merusak tubuh. Penelitian di bidang gizi ortomolekuler membuktikan bahwa antioksidan dapat melindungi jaringan tubuh dari efek negatif radikal bebas. Gangguan atau ketidakmampuan sistem antioksidan tubuh inilah yang menyebabkan berbagai macam penyakit degeneratif.

2.2 Radikal bebas

Radikal bebas adalah molekul atau atom yang mempunyai satu elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya (Astuti, 2008). Dengan demikian, secara teoritis radikal bebas dapat terbentuk bila terjadi pemisahan ikatan kovalen. Senyawa ini dianggap berbahaya karena sangat reaktif dalam upaya mendapatkan

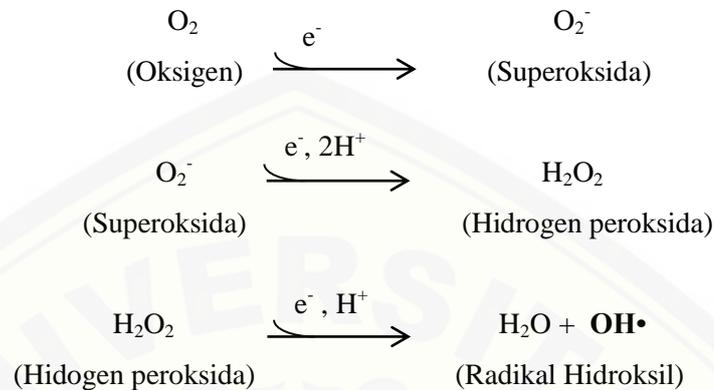
elektron pasangannya dengan cara mengambil elektron dari suatu molekul yang ada di sekitarnya. Radikal bebas mampu bereaksi dengan setiap molekul untuk menarik elektron, dan membentuk radikal bebas yang baru dalam reaksi berantai yang menyebabkan stress oksidatif dan menyebabkan timbulnya berbagai penyakit (Muhilal, 1991).

Radikal bebas bagai dua sisi yang bertolak belakang. Dalam kapasitas normal, radikal bebas berguna bagi tubuh yaitu bekerja melindungi jaringan tubuh yang sehat dari kerusakan (Muhilal, 1991). Keberadaannya diperlukan untuk melawan peradangan maupun membunuh kuman penyebab penyakit. Namun, jika dalam keadaan berlebihan akan menjadi ancaman karena dapat melumpuhkan mekanisme keseimbangan yang bekerja di dalam tubuh dan menyebabkan serangan yang dapat menimbulkan kerusakan di berbagai sel-sel penting bagi tubuh (Lingga, 2012). Kerusakan tersebut meliputi kerusakan membran sel, protein, DNA, dan lipid serta dapat menimbulkan berbagai macam penyakit seperti katarak, kanker, artheosklerosis, dan proses penuaan (Muhilal, 1991).

Radikal bebas yang dihasilkan oleh tubuh secara alami disebut radikal bebas endogen, sedangkan yang berasal dari luar tubuh disebut radikal bebas eksogen. Radikal bebas endogen berasal dari proses biokimia yang berlangsung di dalam sel (intraselular) dan di luar sel (ekstraselular) yang terus menerus terjadi selama hidup. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari paparan asap rokok, radiasi ultraviolet, obat-obatan, zat kimia serta polutan yang lain (Lingga, 2012).

Radikal bebas terpenting di dalam tubuh adalah radikal derivat dari oksigen yang disebut kelompok oksigen reaktif (*reactive oxygen species* atau ROS). ROS merupakan radikal bebas terpenting di dalam tubuh karena memiliki peranan dalam ekspresi gen, apoptosis dan transportasi ion. Namun jika ROS dalam jumlah banyak dapat menimbulkan kerusakan pada banyak molekul seperti DNA, lemak, dan protein (Lu *et al.*, 2010). Radikal superoksida (O_2^-), radikal hidroksil ($OH\bullet$), radikal organik (R^\cdot), radikal peroksida organik ($RCOO^\cdot$), bentuk oksigen yang tereduksi yaitu hidrogen peroksida (H_2O_2), dan asam hipoklorus ($HOCl$) merupakan beberapa contoh ROS. Radikal hidroksil merupakan salah satu ROS yang paling reaktif, lebih toksik dibandingkan dengan kelompok radikal lain, dan

menjadi inisiator reaksi berantai yang membentuk peroksida lemak (Marks *et al.*, 2000). Proses reduksi pada oksigen yang menghasilkan superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Proses reduksi pada oksigen yang menghasilkan superoksida, hidrogen peroksida dan radikal hidroksil (Sumber: Marks *et al.*, 2000)

Radikal hidroksil dihasilkan melalui reaksi fenton dari pengoksidasian hidrogen peroksida dan dengan adanya logam (Fe^{2+}). Pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi fenton dapat dilihat pada Gambar 2.2. Namun O_2^- (superoksida) juga dapat menghasilkan radikal hidroksil yang lebih reaktif melalui reaksi dengan hidrogen peroksida dalam reaksi Haber-Weiss (Marks *et al.*, 2000). Pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi Haber-Weiss dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Reaksi Fenton:



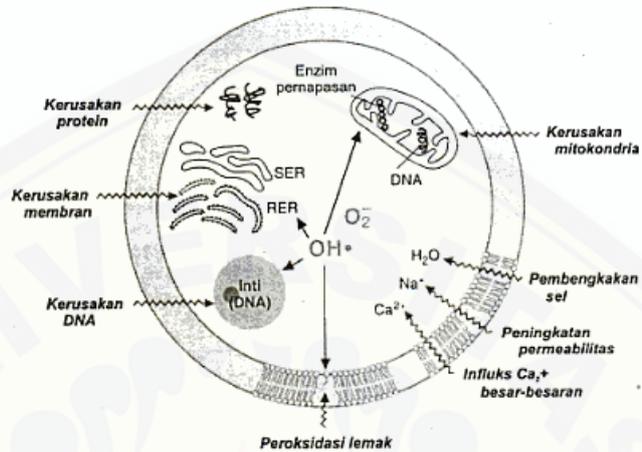
Reaksi Haber-Wiss:



Gambar 2.2 Reaksi Pembentukan radikal hidroksil oleh reaksi Fenton dan Haber-Weiss (Sumber: Marks *et al.*, 2000)

Radikal hidroksil juga merupakan sumber utama kerusakan DNA. Pengikatan Fe^{2+} dengan DNA mempermudah menyebabkan pemutusan untai dan perubahan basa DNA. Radikal hidroksil dan superoksida dapat mencetuskan peroksidasi lemak di membran sel, kerusakan pada mitokondria, inti, dan retikulum endoplasma. Peningkatan permeabilitas sel menyebabkan masuknya

Ca^{2+} , sehingga menyebabkan kerusakan mitokondria lebih lanjut (Marks *et al.*, 2000). Cedera sel yang diperantarai oleh radikal bebas ini dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Cedera sel yang diakibatkan oleh radikal bebas (Sumber: Marks *et al.*, 2000)

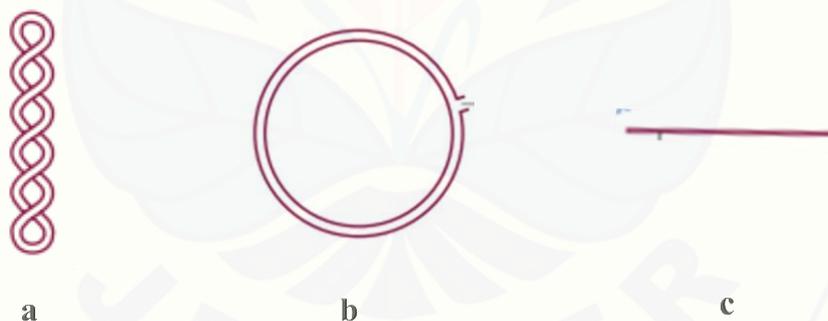
Meningkatnya akumulasi dari ROS dapat menimbulkan toksisitas bahkan kematian sel. Seperti halnya radikal bebas yang dihasilkan dari berbagai sel dalam jumlah yang sedikit, maka keberadaan antioksidan di dalam maupun di luar tubuh juga diharapkan mengimbangi reaksi radikal bebas yang terbentuk (Ivanova & Ivanov (2000) dalam Harliansyah (2001)).

2.3 Kerusakan DNA

DNA (*deoxyribonucleic acid*) merupakan materi genetika pada sel yang dimiliki oleh hampir semua organisme hidup. Sebagian besar DNA berada di dalam inti sel (DNA inti) dan sebagian kecilnya ditemukan di dalam mitokondria (DNA mitokondria). DNA pada manusia memiliki pasangan basa yang terdiri dari adenin (A), timin (T), guanin (G), dan sitosin (C) (Brookes, 2005). Peristiwa pada basa-basa DNA yang mengalami kerusakan akibat interaksi kimiawi dengan sumber-sumber endogen maupun eksogen disebut kerusakan DNA (Hwang & Bowen, 2010). Kerusakan DNA adalah kelainan pada struktur kimia DNA, seperti pemutusan *double strand* dan adanya perubahan kimia dasar seperti *8-hydroxydeoxyguanosine*. Kerusakan DNA disebabkan karena adanya interaksi

asam nukelat DNA dan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dengan membentuk 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OhdG). 8-*hydroxydeoxyguanosine* (8-OhdG) dianggap sebagai penanda kerusakan oksidatif DNA (Kasai, 1997). Kerusakan DNA ini terakumulasi di otak, otot, hati, dan ginjal. Akumulasi kerusakan DNA tersebut merupakan penyebab kemungkinan penurunan ekspresi gen dan hilangnya kapasitas fungsional dengan bertambahnya usia (Nisha & Deshwal, 2011).

Selain pada manusia, DNA juga ditemukan pada organisme uniseluler. Salah satunya adalah bakteri. Pada bakteri, terdapat DNA kromosom yang berbentuk superkoil dan berukuran besar. Selain kromosom, pada DNA bakteri juga ditemukan DNA plasmid yang berbentuk sirkuler dan memiliki ukuran lebih kecil dari kromosom (Gaffar, 2007). Ukuran plasmid bermacam-macam, sekitar 1 kb – lebih dari 200 kb (Dwijoseputro, 2003). Selain itu, plasmid DNA memiliki tiga konformasi yaitu *supercoil*, *open circular*, dan *linear* (Browm, 2010). Untuk mendapatkan DNA plasmid, maka dilakukan isolasi plasmid dengan tahap pertumbuhan dan pemanenan bakteri yang dilanjutkan dengan pemurnian plasmid (Faatih, 2009). Konformasi plasmid DNA dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Konformasi plasmid DNA; (a) *supercoil*; (b) *open circular*; (c) *linear*
(Sumber: Browm, 2010)

Elektroforesis gel agarosa dapat digunakan secara efektif untuk deteksi dan karakterisasi plasmid DNA. Elektroforesis gel agarosa adalah metode yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang memiliki perbedaan ukuran lebih besar. Pita-pita DNA pada gel dapat diamati secara spesifik dengan menggunakan zat pewarna seperti etidium bromida (Marks, 2000). Etidium bromida akan menyisip di antara basa-basa DNA. Penggunaan etidium bromida

dimaksudkan untuk membantu visualisi, karena zat pewarna ini akan berpendar saat gel disinari dengan ultraviolet dari bawah, sehingga nampak pita-pita pada gel agarosa. Pita-pita tersebut merupakan molekul-molekul DNA yang bergerak sepanjang gel setelah dielektroforesis (Yuwono, 2009). Gel agarosa dilakukan secara horizontal dalam kekuatan medan listrik dan arah tetap, seperti ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Elektroforesis gel agarosa (Sumber: Reddy & Raju, 2012)

Faktor yang mempengaruhi laju migrasi DNA yaitu ukuran molekul DNA, konsentrasi gel agarosa dan konformasi DNA. Molekul yang berukuran lebih kecil akan lebih mudah melalui pori-pori (matriks) gel sehingga laju migrasinya lebih cepat. Sedangkan konsentrasi agarosa yang digunakan akan menentukan besarnya pori-pori gel yang akan memisahkan DNA. Semakin rendah konsentrasi agarosa, maka matriks gel akan semakin kecil dan fragmen DNA dapat dipisah semakin jauh berdasarkan ukurannya (Poland & Scheraga, 1970). Laju migrasi juga tergantung pada bentuk atau konformasi DNA. Urutan konformasi DNA mulai dari yang paling cepat adalah *supercoil* (SC), *open circular* (OC), dan *linear* (Meyers *et al.*, 1976).

Sebelum melakukan elektroforesis gel agarosa, maka dapat dilakukan isolasi plasmid kemudian pengukuran kemurnian plasmid secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer. Isolasi plasmid dapat dilakukan menggunakan metode *mini preparation* (*mini-prep*) (Sambrook & Russell, 2006). Proses pertama yang dilakukan yaitu kultur bakteri selama 16 jam, lalu disentrifus. Kemudian hasil sentrifus berupa pelet dilanjutkan dengan pemberian larutan I, II dan III. Kandungan glukosa dengan konsentrasi tinggi pada larutan I yang dapat

merusak membran sel. Kemudian pemberian larutan II yang digunakan NaOH (alkali kuat) dan SDS yang berfungsi untuk merusak sel. Sedangkan larutan III berfungsi sebagai penetral. Selanjutnya disentrifus untuk mendapatkan supernatan yang berisi DNA. Supernatan yang diperoleh kemudian ditambahkan dengan PCI yang berfungsi untuk menghilangkan komponen-komponen lain dalam sel, misalnya protein. Supernatan yang dihasilkan ditambahkan natrium asetat dan etanol absolut (96%) yang berfungsi untuk membantu pengendapan plasmid. Kemudian inkubasi -20°C selama 1 jam, disentrifus dan penambahan etanol 70% yang bertujuan untuk membersihkan sisa-sisa larutan sehingga diperoleh plasmid yang murni. Kemudian ditambahkan 40 μL *double distillation water* (ddH₂O).

Hasil isolasi yang diperoleh berupa plasmid murni. Kemudian kemurnian plasmid dilihat menggunakan *nanodrop* spektrofotometer. Pada kemurnian DNA dapat dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 (A₂₆₀/A₂₈₀), sedangkan nilai (A₂₆₀/A₂₃₀) menunjukkan kemurnian asam nukleat (Nugroho & Rahayu, 2016). Nilai A₂₆₀/A₂₈₀ menunjukkan pita ganda pada DNA dapat menyerap cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 280 nm. Menurut Fatchiyah *et al.* (2011), nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8–2,0.

Proteksi terhadap kerusakan DNA dapat dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1%. Proteksi terhadap kerusakan DNA dapat dilihat dengan penghambatan perubahan pita *supercoil* yang diinisiasi radikal hidroksil melalui reaksi fenton. Pada reaksi fenton, hasil H₂O₂ menjadi OH• melalui reaksi $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$, dimana OH• yang bersifat reaktif dan dapat menyebabkan perubahan konformasi pita *supercoil* (Louis *et al.*, 2014). Penghambatan kerusakan DNA tersebut dapat diatasi dengan senyawa antioksidan yang merupakan terapi alternatif sebagai perlindungan terhadap kerusakan DNA (Nisha & Deshwal, 2011). Salah satu contoh antioksidan yang berperan dalam menangkap radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan sel yaitu *glutathion sulphhydryl* (GSH). GSH merupakan suatu tripeptida yang terdiri dari asam glutamat, sistein, dan glisin (Murray *et al.*, 2009). GSH ini memiliki kemampuan

menghambat radikal hidroksil yang bertujuan untuk menghilangkan radikal bebas yang berlebihan (Afriza, 2013) dan merupakan antioksidan yang sering diukur untuk melihat dampak peningkatan radikal bebas dalam tubuh. Adanya gugus sulfhidril ini yang menyebabkan GSH berperan sebagai pendonor elektron yang kuat dalam menangkal radikal (Safyudin & Subandrate, 2015).

2.4 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa alami yang dapat melindungi sel tubuh kita dari kerusakan dan penuaan yang disebabkan oleh molekul reaktif. Antioksidan merupakan zat yang dalam kadar rendah mampu menghambat laju oksidasi molekul target (Swastika *et al.*, 2013). Antioksidan berfungsi untuk menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron dari radikal bebas, sehingga dapat menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Windono *et al.*, 2001). Dalam mekanisme kerjanya, senyawa alami tersebut menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat molekul liar serta menjaga struktur genetik dari suatu sel agar tetap dalam kondisi yang stabil. Dalam melakukan aktivitasnya, antioksidan bekerja melalui berbagai cara, yaitu mencegah terbentuknya molekul radikal, mereduksi molekul radikal sehingga tidak menjadi berbahaya, mengeliminasi molekul yang rusak dan mencegah terjadinya mutasi (Lingga, 2012). Peran antioksidan yaitu menghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas atau menetralkan radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan sel dan juga merusak biomolekul, seperti DNA, protein, lipoprotein di dalam tubuh yang akhirnya dapat memicu terjadinya penyakit degeneratif (Sie, 2013).

Sumber-sumber antioksidan dapat berasal dari sintetik maupun alami (Barua *et al.*, 2015). Tetapi saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena dari beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan, bahwa antioksidan sintetik seperti *butylated hydroxy toluena* (BHT) ternyata dapat meracuni binatang percobaan dan bersifat karsinogenik. Oleh sebab itu, banyak penelitian mengembangkan antioksidan alami dan mencari sumber-sumber antioksidan alami baru. Kebanyakan sumber antioksidan alami berasal dari tumbuh-tumbuhan

seperti minyak, biji-bijian, daun dan kacang-kacangan, serta sumber antioksidan alami ini tergolong aman (Miyake & Shibamoto, 1997). Melinjo diketahui merupakan sumber antioksidan yang alami (Siswoyo *et al.*, 2007).

2.5 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Tanaman melinjo termasuk dalam tumbuhan berbiji terbuka, tidak terbungkus daging tetapi terbungkus oleh kulit luar. Pada tanaman melinjo buah yang terlihat bukan merupakan buah sejati. Buah yang sebenarnya adalah biji yang terbungkus oleh selapis aril yang berdaging. Kulit pada biji berwarna kuning, kemerah-merahan atau lembayung. Tanaman ini dapat tumbuh pada tanaman berkapur, tetapi tidak tahan terhadap dengan tanah yang memiliki air dalam kandungan banyak. Tanaman yang tumbuh dan tersebar di berbagai tempat, serta banyak ditemukan di tanah-tanah perkarangan penduduk desa maupun kota (Sunarto, 1991).

Klasifikasi tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menurut Tjitrosoepomo (2004) sebagai berikut:

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

Tanaman melinjo dapat tumbuh tinggi sekitar hingga 5-10 meter, berkelamin dua, kulit batang berwarna kelabu, gelang-gelang batang timbul, dan cabang-cabangnya melingkari batang sampai di pangkal. Daun-daunnya berhadapan, berbentuk jorong, tulang daun sekunder melengkung. Buahnya berbentuk jorong, berbulu halus, awalnya berwarna kuning, tetapi jika matang akan berubah menjadi warna merah sampai lembayung (Tjitrosoepomo, 2004).

Melinjo memiliki banyak kegunaan pada setiap bagiannya. Kayunya dapat digunakan sebagai bahan papan dan alat rumah tangga sederhana. Daun mudanya

digunakan sebagai bahan sayuran. Bagian paling penting dari melinjo adalah biji. Biji melinjo dapat digunakan sebagai bahan makanan dalam bentuk kering, dimasak maupun diawetkan. Melinjo adalah sumber protein fungsional yang cocok sebagai suplemen makanan, substansi yang mempunyai manfaat bagi kesehatan, termasuk mencegah dan mengobati penyakit (Tampubolon, 2013). Tanaman biji melinjo dapat dilihat pada Gambar 2.6.



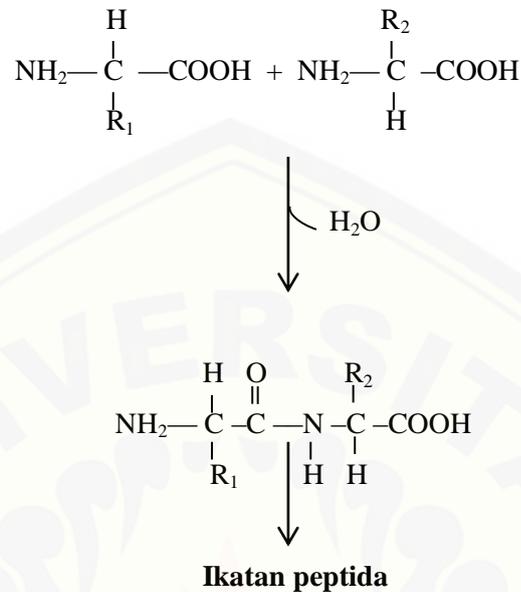
Gambar 2.6 Biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) (Sumber: Tampubolon, 2013)

Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo *et al.*, 2007). Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, dilaporkan bahwa protein isolat biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terhidrolisis memiliki potensi aktif sebagai antioksidan (Siswoyo & sugiharto, 2012). Aktivitas antioksidan ini diperoleh dari konsentrasi protein yang tinggi pada tiap bijinya (Siswoyo *et al.*, 2011). Selain itu, protein biji melinjo yang terhidrolisis dengan enzim alkalase memiliki penghambatan paling efektif pada kemampuan dalam melindungi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil dan mempunyai peredaman radikal hidroksil paling efektif (Sembodo, 2015).

2.6 Protein

Protein merupakan makromolekul yang terbentuk dari gabungan asam amino-asam amino yang mengandung atom nitrogen, karbon, hidrogen dan oksigen, yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Dalam makhluk hidup, protein berperan sebagai pembentuk struktur sel dan beberapa jenis protein memiliki

peran fisiologis (Bintang, 2010). Struktur umum dari protein dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Struktur umum protein (Sumber: Walsh, 2002)

Berdasarkan bentuk molekulnya, protein digolongkan menjadi protein globular (albumin, globulin, dan hemoglobin) dan protein serabut (kreatin pada rambut dan fibroin pada sutra). Berdasarkan tingkat kelarutannya dalam air, protein globular sangat mudah larut dalam air, sedangkan protein serabut tidak larut dalam air (Bintang, 2010).

Berdasarkan stukturanya, protein dibedakan menjadi 4 macam (Bintang, 2010):

a. Struktur primer

Struktur ini terdiri dari asam-asam amino yang dihubungkan satu sama lain secara kovalen melalui ikatan peptida.

b. Struktur sekunder

Protein sudah mengalami interaksi intermolekuler, melalui rantai samping asam amino. Ikatan yang membentuk struktur ini didominasi oleh ikatan hidrogen antar rantai samping yang terjadi di antara oksigen karbonil dan nitrogen amida pada kerangka peptida, ada dua bentuk dari struktur sekunder yaitu *α-heliks* dan *β-sheet*.

c. Struktur tersier

Struktur ini terbentuk karena adanya pelipatan membentuk struktur yang kompleks dan merupakan rangkaian molekular yang menggambarkan bentuk keseluruhan protein. Jenis ikatan yang membentuk struktur tersier terdiri dari ikatan hidrogen, ikatan ionik, ikatan disulfida, dan ikatan hidrofobik.

d. Struktur kuaterner

Dibentuk oleh beberapa polipeptida yang berikatan satu sama lain tidak secara kovalen.

1.6.1 Isolasi Protein

Isolasi protein pada prinsipnya didasarkan atas dua proses utama yaitu ekstraksi dan presipitasi. Isolat protein dibuat dengan cara mengendapkan protein pada titik isoelektriknya. Dengan cara ini, protein dapat diisolasi dan dipisahkan dari bagian bahan lainnya yang tidak diinginkan (Triyono, 2010).

Ekstraksi merupakan proses awal untuk mendapatkan protein kasar dengan cara memisahkan protein dari zat campuran lainnya dengan menggunakan sejumlah pelarut sebagai pemisah. Proses ekstraksi secara umum dipengaruhi oleh pelarut, temperatur, ukuran bahan, dan waktu kontak, sedangkan tekanan tidak berpengaruh (Hartati & Kurniasari, 2010).

Protein dapat dipresipitasi dengan adanya gangguan pelarut melalui penambahan garam (*salting out*), pengaturan suhu, pengaturan pH, dan penambahan pelarut organik (Bintang, 2010).

a. Pengendapan garam

Amonium sulfat memiliki daya larut yang sangat tinggi dan garam ini paling banyak digunakan untuk fraksinasi protein-protein. Metode yang digunakan yaitu *salting out*.

b. Pengaturan suhu

Kenaikan suhu dapat menyebabkan penurunan daya larut, sehingga pemanasan dilakukan secara hati-hati untuk mengeliminasi protein yang tidak diinginkan.

c. Pengaturan pH

Daya larut protein tergantung pada pH dan mencapai minimum pada titik isoelektriknya. Kelarutan protein akan meningkat pada pH basa 8-9, sehingga pada keadaan ini sangat bagus untuk mengekstrak protein. Sedangkan pada pH asam 4-6 akan mengalami presipitasi protein, sehingga menurunkan interaksi dengan air (Salcedo *et al.*, 2002).

d. Pelarut organik

Pelarut-pelarut organik ini dapat menyebabkan protein mengendap dengan cara menurunkan konstanta dielektrik, yang mengakibatkan peningkatan interaksi antara protein dengan protein.

Metode isolasi protein yang digunakan yaitu *isoelectric precipitation*, dengan cara mengatur pH. Metode *isoelectric precipitation* merupakan pengendapan protein berdasarkan titik isoelektrik. Sampel diatur pHnya menjadi 4 dengan menambahkan 1 M HCl, sehingga protein akan mengendap pada titik isoelektriknya. Pengendapan protein ini karena pada pH 4 kelarutan protein menjadi menurun akibat dari muatan positif dan negatif molekul protein yang sama, sehingga interaksi antar molekul protein meningkat dan interaksi antara molekul protein dengan air menurun (Salcedo *et al.*, 2002). Hal tersebut menyebabkan protein tidak larut air dan membentuk endapan. Sehingga pada saat larutan disentrifus, hasil berupa cairan dibuang karena mengandung zat yang tidak diinginkan seperti gula dan mineral sedangkan endapan (pelet) digunakan karena mengandung protein yang lebih murni. Pelet diresuspensi kembali menggunakan akuades dan diatur pHnya sampai 8 menggunakan NaOH 1 N, karena pada pH tersebut kelarutan protein akan meningkat (Salcedo *et al.*, 2002).

1.6.2 Hidrolisis Protein

Menurut Hasnaliza *et al.* (2010), hidrolisis protein merupakan protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa atau enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida.

Ada tiga cara yang dapat ditempuh untuk menghidrolisis protein (Sediaoetama, 2010):

a. Hidrolisis asam

Hidrolisis dengan menggunakan asam kuat anorganik, seperti HCl atau H₂SO₄ pekat dan dipanaskan pada suhu mendidih, dapat dilakukan dengan tekanan di atas satu atmosfer dan dilakukan selama beberapa jam.

b. Hidrolisis basa

Hidrolisis dengan menggunakan basa atau alkali kuat, seperti NaOH dan KOH, dilakukan selama beberapa jam, pada suhu tinggi, dengan tekanan di atas satu atmosfer.

c. Hidrolisis enzimatis

Hidrolisis yang dilakukan dengan menggunakan enzim. Dapat digunakan satu jenis enzim atau beberapa enzim yang berbeda dan hidrolisis dilakukan pada pH dan suhu optimum.

Hasil dari hidrolisis secara kimia (asam atau basa) yaitu beberapa asam amino mengalami kerusakan dan beberapa lagi mengalami perubahan menjadi derivatnya, sedangkan hasil dari hidrolisis enzimatis lebih baik dari hidrolisis secara kimia, yaitu tidak ada asam amino yang rusak atau mengalami modifikasi menjadi derivatnya. Hidrolisis enzimatis lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan pada asam amino (Kristinsson, 2007) serta peptida dengan rantai pendek yang dihasilkan lebih bervariasi, reaksi dapat dipercepat, tingkat kehilangan asam amino lebih rendah, biaya produksi relatif lebih murah dan menghasilkan komposisi asam amino tertentu terutama peptida rantai pendek (dipeptida dan tripeptida) yang mudah diabsorpsi oleh tubuh (Prasetyo *et al.*, 2012).

Selain itu, hidrolisis secara enzimatis dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari suatu protein (Elias *et al.*, 2008). Protein dengan berat molekul yang rendah dapat diperoleh dengan menghidrolisis protein secara enzimatis (Zhidong *et al.*, 2013). Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. Hal ini disebabkan karena kemampuan enzim

dalam menghidrolisis protein dapat menghasilkan produk hidrolisat yang terhindar dari perubahan dan kerusakan produk (Hasnaliza *et al.*, 2010).

Alkalase adalah enzim alkalin yang diproduksi dari *Bacillus licheniformis*. Alkalase merupakan enzim terbaik digunakan dalam preparasi protein hidrolisat (Bhaskar *et al.*, 2008) dan digunakan untuk imobilisasi (Corici *et al.*, 2011). Menurut Siswoyo *et al.* (2013), enzim alkalase merupakan enzim yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan tertinggi di antara enzim tripsin dan peptin. Derajat hidrolisis (DH) merupakan parameter utama untuk mengetahui berapa persen ikatan peptida yang dipotong pada reaksi hidrolisis. Derajat hidrolisis dapat dihitung menggunakan Persamaan 2.1.

$$\text{Derajat hidrolisis} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \dots\dots\dots (2.1)$$

dimana h merupakan jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} merupakan jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein. Metode yang digunakan untuk mendeteksi derajat hidrolisis dalam hidrolisis protein yaitu *trinitro-benzene-sulfonic acid* (TNBS) (Nielsen *et al.*, 2010). Metode TNBS didasarkan pada reaksi primer asam amino dengan reagen TNBS membentuk kromofor yang kemudian dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil reaksi tersebut akan terbentuk warna merah muda yang pekat, menandakan nilai absorbansi tinggi dan menunjukkan semakin banyaknya asam amino atau peptida yang terbentuk (Nissen, 1979). Perhitungan derajat hidrolisis ditentukan dengan mengetahui total asam amino dari sampel awal Gg-PI yang dihidrolisis menggunakan HCl untuk mencari h_{tot} (100% sampel terhidrolisis) dan asam amino terlarut dari protein terhidrolisis.

1.6.3 Analisis Kuantitatif Protein

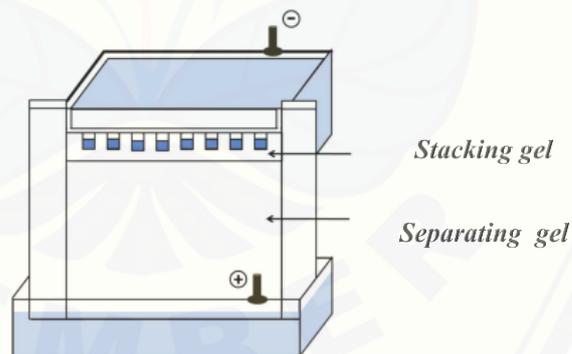
Metode yang sering digunakan untuk menentukan kadar protein yaitu metode Bradford, karena metode ini paling cepat, mudah dan akurat dibandingkan dengan metode lainnya (Bradford, 1976). Metode Bradford merupakan metode pengukuran konsentrasi protein total yang melibatkan pewarna *coomassie brilliant blue* (CBB). CBB akan berikatan dengan protein pada sampel larutan dalam suasana asam (Purwanto, 2014). Penentuan kadar protein diperoleh

berdasarkan absorbansi maksimum untuk larutan *coomassie brilliant blue* (CBB) pada panjang gelombang 595 nm, ketika terjadi pengikatan protein. Kelemahan uji Bradford yaitu memiliki kurva linier pada rentang pendek, biasanya antara 2-120 $\mu\text{g/mL}$, sehingga perlu pengenceran sampel sebelum dianalisis. Selain itu, reaksi juga terhambat jika sampel mengandung detergen (Bintang 2010).

1.6.4 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu cara untuk memisahkan fraksi-fraksi campuran berdasarkan pergerakan partikel-partikel koloid yang bermuatan di bawah pengaruh medan listrik. Secara umum elektroforesis banyak digunakan untuk menganalisis asam nukleat, virus, enzim, protein dan DNA (Bintang, 2010).

Elektroforesis gel *polyacrylamide* merupakan metode yang digunakan secara luas pada saat ini. Metode ini menggunakan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) yang bertujuan untuk mendenaturasi protein. Metode elektroforesis yang demikian disebut *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS PAGE) (Bintang, 2010). Skema elektroforesis gel poliakrilamid dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Elektroforesis gel poliakrilamid (Sumber: Sattayasi, 2012)

Elektroforesis gel *polyacrylamide* dapat digunakan untuk pemisahan, identifikasi, dan pemurnian protein. Teknik ini merupakan teknik sederhana, cepat dan dapat memisahkan molekul yang diinginkan dari matriksnya (Sudjadi, 2008). Gel *polyacrylamide* tidak hanya digunakan untuk pemisahan dari berbagai protein, tetapi juga untuk membandingkan berat molekulnya (Bintang, 2010).

Protein yang dielektroforesis dapat dianalisis dengan pengecatan menggunakan *coomassie blue*. Untuk menentukan berat molekul protein, dilakukan dengan menghitung Rf dari masing-masing pita dan dibandingkan dengan protein standar yang sudah diketahui berat molekulnya (Hanafiah & Allza, 2013). Pita protein lebih banyak di bawah dengan berat molekul lebih kecil, sedangkan pita protein pada bagian atas dengan berat molekul lebih besar (Sugiharsono *et al.*, 2014).

2.7 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim merupakan enzim yang diikatkan pada padatan pendukung maupun penjerapan pada matriks, sehingga dapat menahan aktivitas katalitiknya (Katzir, 1993). Metode imobilisasi yang ideal harus mudah pengerjaannya dan tidak merusak substansi yang mengalami imobilisasi. Keuntungan dari teknik imobilisasi adalah lebih mudah dalam memisahkan produk yang dihasilkan, dapat digunakan secara berulang-ulang, sistem yang lebih stabil (Bintang, 2010). Hal ini dikarenakan adanya padatan pendukung yang dapat melindungi enzim dari denaturasi, sehingga enzim masih dapat mempertahankan aktivitasnya (Wardoyo *et al.*, 2015).

Metode imobilisasi enzim meliputi ikatan pada matriks pendukung (*carrier binding*), ikatan silang (*cross linking*) dan penjerapan (Dumitriu, 2002).

1. Metode *carrier binding*

Metode *carrier binding* adalah teknik tertua pada imobilisasi enzim. Dalam metode ini, jumlah enzim yang terikat pada pembawa dan aktivitas setelah imobilisasi tergantung pada sifat dari enzim itu sendiri dan karena hal tersebut, ada beberapa aspek yang harus diperhatikan. Aspek yang perlu diperhatikan di antaranya ukuran partikel, luas permukaan, perbandingan molar hidrofilik dan hidrofobik serta komposisi kimia enzim. Metode *carrier binding* dibagi menjadi tiga jenis, yaitu adsorpsi fisik, ikatan ionik, dan ikatan kovalen (Kumar & Greg, 2002).

a. Adsorpsi fisik

Metode adsorpsi adalah metode paling sederhana dan melibatkan interaksi permukaan reversibel antara enzim dan material pembawa. Keuntungan dari metode ini yaitu cepat dan murah, sederhana, reversibel, dan tidak ada perubahan konformasi enzim. Kelemahan dari metode ini adalah enzim yang diserap dapat bocor selama pemakaian dan dapat mengkontaminasi produk (Erlashar, 2010).

b. Ikatan ionik

Metode pengikatan ionik ini didasarkan pada ionik protein enzim pada pembawa yang tidak larut air yang mengandung residu pertukaran ion. Sebagai pembawa untuk ikatan ionik, polisakarida dan polimer sintetik memiliki residu pertukaran ion yang digunakan. Metode ini memiliki kelemahan yaitu kehilangan aktivitas atau perubahan spesifitas aktivitas akibat adanya perubahan konformasi enzim.

c. Ikatan kovalen

Metode ikatan kovalen merupakan metode yang melibatkan pembentukan ikatan kovalen antara enzim dan material pembawa. Ikatan kovalen memiliki hubungan kuat antara enzim dan pembawanya, dibandingkan dengan jenis lain dari metode imobilisasi enzim. Dengan demikian, kebocoran enzim dari matriks sering diminimalkan dengan kovalen terikat. Kelebihan dari metode ini yaitu tidak ada kebocoran enzim. Namun kelemahannya yaitu biaya yang dibutuhkan sangat mahal dan kemungkinan hilangnya aktivitas enzim.

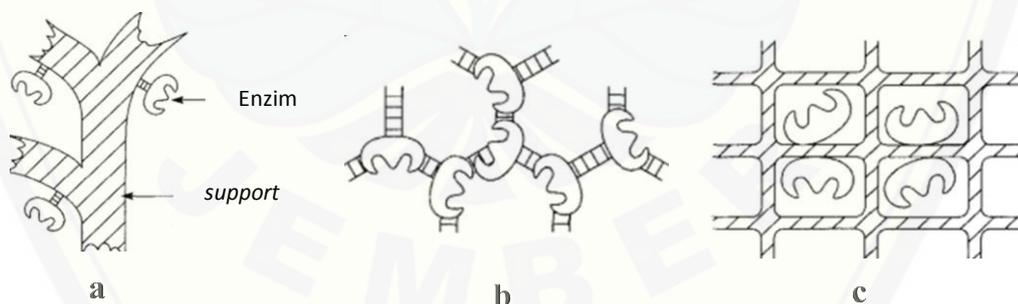
2. Metode *Cross linking*

Metode *cross linking* didasarkan pada pembentukan ikatan intermolekuler antara molekul-molekul enzim dengan pembawa. Dengan teknik ini, enzim akan terikat cukup kuat pada pembawa, sehingga kemungkinan untuk terjadi desorpsi enzim sangat kecil. Walaupun demikian, teknik ini dapat menyebabkan terjadi perubahan sisi aktif enzim secara bermakna dan aktivitas enzim setelah diimobilisasi menjadi sangat rendah (Elnashar, 2010).

3. Metode Penjerapan

Metode penjerapan berbeda dari metode lainnya, karena enzim tidak terikat pada kisi-kisi membran atau polimer. Metode ini didasari oleh penempatan enzim dengan pola matriks polimer dan membran. Metode penjerapan memiliki beberapa keuntungan di antaranya adalah metode ini mudah, tidak memerlukan waktu dan biaya yang banyak dan lebih hemat dalam penggunaan. Namun kelemahan metode ini yaitu lepasnya enzim dari matriks karena ukuran enzim lebih kecil dari sel, selain itu penjerapan umumnya menggunakan matriks *polyacrylamide* gel yang bersifat karsinogenik.

Teknik imobilisasi yang paling baik adalah yang memenuhi kriteria utama yaitu tidak terjadi perubahan konformasi enzim dan tidak mengganggu gugus fungsi di pusat aktif enzim sehingga enzim tetap dapat berfungsi (Sangeetha *et al.*, 2008). Metode penjerapan lebih banyak digunakan karena lebih efisien dibandingkan dengan metode imobilisasi lainnya karena enzim ada dalam keadaan bebas dan tidak terikat pada bahan pendukung sehingga secara relatif fungsi katalitik dan struktur alami molekul enzim tidak mengalami gangguan (Wirahadikusumah, 1985). Metode yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu metode penjerapan. Metode imobilisasi enzim ini dapat dilihat pada Gambar 2.9.



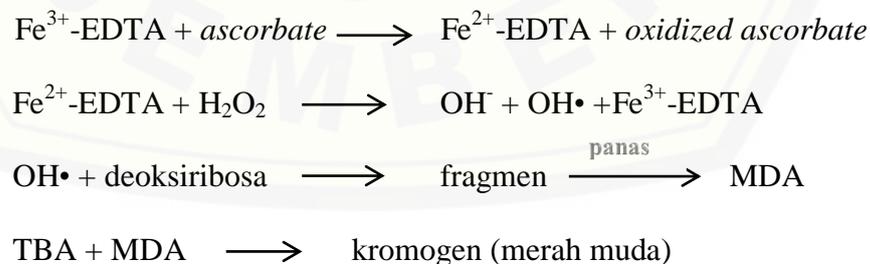
Gambar 2.9 Metode imobilisasi enzim; (a) metode *carrier binding*; (b) metode *cross linking*; (c) metode penjerapan (Sumber: Katzir, 1993)

2.8 Penentuan Aktivitas Antioksidan melalui Peredaman Radikal Hidroksil

Kapasitas penghambatan radikal hidroksil suatu ekstrak berhubungan langsung dengan aktivitas antioksidannya. Peredaman radikal hidroksil diuji menggunakan metode deoksiribosa (Halliwell *et al.*, 1987). Pada metode ini

melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan Fe^{3+} dengan menggunakan reaksi fenton (Shivaprasad dalam Febriani 2012). Untuk menghasilkan radikal hidroksil diperlukan reaksi fenton. Dalam reaksi fenton, vitamin C (*ascorbate*) berfungsi untuk mempercepat proses reduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Semakin cepat Fe^{3+} direduksi menjadi Fe^{2+} maka radikal hidroksil juga akan semakin cepat terbentuk karena Fe^{2+} akan bereaksi dengan dengan H_2O_2 dan menghasilkan radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$). Penambahan EDTA pada besi dapat meningkatkan kecepatan reaksi antara Fe^{2+} dan H_2O_2 .

Radikal hidroksil yang terbentuk dari reaksi fenton akan mendegradasi deoksiribosa kemudian membentuk produk yang dinamakan malonaldehid (MDA). Kemudian campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C . Digunakan suhu 37°C dengan alasan untuk menyerupai kondisi seperti pada tubuh manusia normal. Pada saat proses inkubasi, adanya reaksi antara deoksiribosa dengan radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi fenton. Radikal hidroksil akan menyerang deoksiribosa sehingga deoksiribosa akan mengalami degradasi atau kerusakan. Malonaldehid merupakan senyawa yang tidak berwarna. Senyawa ini dapat diidentifikasi dengan asam tiobarbiturat (TBA) yang akan membentuk kompleks (ikatan MDA-TBA) berwarna merah muda, sehingga dapat ditetapkan secara spektrofotometri (Gambar 2.10). Larutan yang mengandung ikatan MDA-TBA akan berubah warna menjadi merah muda jika melalui proses pemanasan dan dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm (Halliwell *et al.*, 1987).



Gambar 2.10 Reaksi pembentukan ikatan MDA-TBA akibat radikal hidroksil
(Sumber: Halliwell *et al.*, 1987)

Besarnya aktivitas antioksidan diperoleh berdasarkan peredaman radikal hidroksil (%). Nilai absorbansi yang diperoleh kemudian dihitung peredaman

radikal hidroksil (%) menggunakan Persamaan 2.2. Selanjutnya data diolah menggunakan analisis menggunakan persamaan regresi linier dari besar peredaman (%), sehingga diperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal hidroksil. Pengujian aktivitas antioksidan pada konsentrasi yang tinggi memiliki tingkat peredaman radikal hidroksil paling efektif. Setelah diperoleh data IC₅₀, kemudian dilanjutkan analisis statistik.

$$\text{Peredaman radikal hidroksil (\%)} = \frac{(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\% \dots\dots (2.2)$$

A_{kontrol} merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Radikal hidroksil merupakan suatu jenis radikal oksigen dengan reaktivitas yang tinggi sehingga biasanya berbahaya bagi makhluk hidup. Radikal hidroksil ini dapat merusak semua tipe makromolekul seperti karbohidrat, asam nukleat, lipid dan asam amino. Cara satu-satunya untuk melindungi sel adalah dengan penggunaan antioksidan untuk meredam reaktivitas dari radikal hidroksil (Wahdaningsih *et al.*, 2011).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh yang timbul akibat dari adanya perlakuan tertentu. Jenis penelitian eksperimental yang digunakan adalah *true experimental laboratories*.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang sudah masak, ditandai dengan kulit biji berwarna merah tua. Biji melinjo diperoleh pada bulan Juli 2015 dipagi hari dari petani di daerah Kalibaru, Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur.

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian ini seluruhnya dilakukan di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Waktu penelitian pada bulan September 2015 – September 2016.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas, vortex, stirer, timbangan analitik, blender, autoklaf, mikropipet, oven (Carbolite), *orbital shaker incubator* (Stuart SI600), *dry block heater* (Techne), sentrifus (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), *microplate reader* (spektrofotometer Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), *syringe* Hamilton, elektroforesis SDS-PAGE (Bio-Rad), *UV transilluminator* (Major science), pH meter (Horiba), *orbital shaker* (Stuart SSL1), *nanodrop* (Nanovue), *gel documentation* (Major science).

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, HCl 1 M, NaOH 1 M, enzim alkalase 2.4 L FG (2,4 AU/g dan densitasnya 1,18 g/mL), isopropil alkohol (Wako), HCl (Sigma), PEG 20000, NaF 1 M (Wako), *dimethyldimethoxysilane* (DMDMOS) (Aldrich), *tetramethoxysilane* (TMOS) (Shin-etsu), buffer fosfat pH 8, *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma), reagen 0,1% *trinitro-benzene-sulfonic acid* (TNBS), Na₂SO₃, 0,1 M reagen Bradford, *ethylene diamine tetra acid* (EDTA), FeCl₃ (Nacalai tesque), H₂O₂ (Riedel-de Haen), deoksiribosa (Wako), asam askorbat (Nacalai tesque), *tiobarbituric acid* (TBA) (Sigma-aldrich), *trichloroacetic acid* (TCA) (Merck), plasmid DNA, media cair luria bertani (LB), antibiotik ampisilin, *agarose* gel 1%, larutan I, II dan III, L-leucin (Wako), *coomasie blue*, *separating gel*, *stacking gel*, larutan pewarna (*staining* dan *destaining*), *running buffer*, marka protein, pewarna etidium bromida.

3.5 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Rancangan penelitian secara skematik

Keterangan:

- S : Sampel biji melinjo
 PK : Protein kasar biji melinjo
 PI : Protein isolat biji melinjo
 PH : Protein hidrolisat biji melinjo

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

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

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil persen (%) peredaman radikal hidroksil, serta pita SC (*supercoil*) pada elektroforesis gel agarosa 1% terhadap sampel uji.

3.6.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah waktu inkubasi, suhu inkubasi, dan ekstraksi sampel.

3.7 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Sampel biji melinjo adalah sampel yang sudah masak, ditandai dengan kulit luar biji melinjo berwarna merah tua.
- b. Protein kasar (PK) adalah ekstrak protein kasar yang diperoleh dari biji melinjo yang sudah dihaluskan kemudian dipisahkan antara supernatan dan pelet. Pengujian ini menggunakan protein kasar dari supernatan.
- c. Protein isolat (PI) adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo yang kemudian dilakukan isolasi protein berdasarkan pengaruh pH dengan metode presipitasi isoelektrik.
- d. Protein terhidrolisis (PH) adalah protein isolat yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase terimobilisasi.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Preparasi Imobilisasi Enzim Alkalase

Imobilisasi enzim alkalase menggunakan metode penjerapan berdasarkan prosedur Reetz (2013). Larutan alkalase 3,12 mL, PEG 20000 0,8 mL, NaF 0,4 mL, dan isopropil alkohol 0,8 mL dicampur dan dihomogenkan dalam vial 10 mL menggunakan batang pengaduk. Kemudian ditambahkan 24 mmol DDMOS/TMOS (1:1). Larutan diaduk pada suhu ruang sampai terbentuk gel. Lalu gel yang diperoleh dikeringkan pada suhu ruang selama 48 jam. Karakterisasi enzim terimobilisasi diamati dengan FTIR dan SEM.

3.8.2 Ekstraksi Biji Melinjo

Ekstraksi biji melinjo dilakukan dengan menggunakan metode standar. Bahan baku yang digunakan adalah 25 gram biji melinjo masak. Pemilihan biji yang sudah masak ini karena pada biji melinjo memiliki kandungan metabolit primer dan sekunder yang sudah berada dalam kondisi optimal. Kulit biji melinjo dibuang dan lapisan kedua pada biji dihilangkan secara manual. Lapisan ketiga pada biji dihaluskan dengan menambahkan akuades 75 ml (1:3) menggunakan blender sampai mendapatkan konsistensi yang halus dan homogen. Selanjutnya, dilakukan penyaringan dengan kasa steril untuk memisahkan larutan dengan ampasnya. Kemudian larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung *macrotube* dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 25°C. Supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar biji melinjo (Gg-PK).

3.8.3 Isolasi Protein Biji Melinjo

Pengisolasian protein menggunakan metode yang dijelaskan Salcedo *et al.* (2002) yaitu presipitasi isoelektrik. Supernatan hasil sentrifus (Gg-PK) diatur pHnya menjadi 4 dengan menambahkan 1 M HCl (Siswoyo & Sugiharto, 2012). Pada pH ini sebagian besar protein akan mengendap di titik isoelektriknya. Kemudian suspensi dibiarkan selama 30 menit untuk memungkinkan protein dapat terendapkan secara sempurna. Larutan disentrifus pada kecepatan 10.000

rpm selama 10 menit pada suhu 25°C untuk memisahkan protein berupa endapan dan cairan sisa yang mengandung bahan-bahan terlarut seperti gula, mineral, dan sebagainya. Endapan protein dilarutkan dengan akuades dan diatur pHnya sampai 8 dengan menggunakan NaOH 1 N. Hasil dari isolasi protein ini disebut sebagai protein isolat biji melinjo (Gg-PI).

3.8.4 Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo

Sebelum dilakukan proses hidrolisis, maka dilakukan optimasi suhu inkubasi, waktu inkubasi, jumlah enzim, dan konsentrasi substrat. Optimasi ini merujuk pada Matra (2016). Suhu inkubasi, waktu inkubasi, jumlah enzim, dan konsentrasi substrat terpilih adalah 50°C, 4 jam, 5 mg, dan 5 mg/mL.

Hidrolisis protein dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Siswoyo & Sugiharto (2012). Protein isolat biji melinjo (Gg-PI) 200 µL ditambah dengan 5 mg enzim alkalase terimobilisasi dan 300 µL buffer fosfat (pH 8). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 50°C selama 4 jam. Kemudian disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Bagian supernatan diambil sebagai protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) dan ditentukan derajat hidrolisisnya. Pelet yang dihasilkan kemudian digunakan untuk melihat hasil pengulangan penggunaan enzim alkalase terimobilisasi.

3.8.5 Pengukuran Total Protein

Kandungan protein diukur dengan menggunakan metode Bradford (1976). Prinsip kerja metode Bradford ini melibatkan pewarna *coomassie brilliant blue* (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna biru. Sampel sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 45 µl akuades dan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorban diukur dengan spektrofotometer pada λ 595 nm. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan standar *bovine serum albumin* (BSA) untuk mengetahui kandungan protein terlarut.

3.8.6 Pengukuran Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan TNBS (Nissen, 1979). Sebanyak 5 μL (Gg-PH) dicampur dengan 400 μL 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 200 μL 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 μL 0,1 N Na_2SO_3 lalu didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya pada λ 420 nm. Kurva standar L-leucine digunakan untuk mengetahui konsentrasi asam amino. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan Persamaan 2.1, dimana h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

3.8.7 Elektroforesis SDS-PAGE

Analisis pola pita protein menggunakan 17% SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) sesuai dengan metode Laemmli (1970). *Separating gel* 17% dituang ke dalam *glass plate electrophoresis* sampai batas. Akuades ditambahkan di atas larutan gel dalam *glass plate electrophoresis* agar permukaan gel tidak bergelombang. Setelah gel memadat, akuades yang menutupi *separating gel* dibuang, kemudian *stacking gel* dituang di atas *separating gel*, *comb* dimasukkan untuk membuat sumuran sampel. *Glass plate* yang sudah berisi gel dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian bawah dan atas gel sampai terendam.

SDS-reducing buffer ditambahkan ke dalam sampel protein (1:1) dalam tabung *microtube* kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 4 menit. Sampel dengan jumlah yang sama dan marka protein sebanyak 2,5 μL dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan *syringe* Hamilton, kemudian dijalankan pada 50-80 volt sampai *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Setelah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *glass plate electrophoresis*.

Gel direndam dalam larutan pewarna (*staining*) dan digoyang pada kecepatan 36 rpm selama 24 jam untuk mewarnai pita protein. Setelah itu, larutan pewarna (*staining*) dituang kembali pada wadah kemudian dicuci dengan akuades. Pencucian gel dilakukan dengan merendam gel di dalam larutan pewarna

(*destaining*) dan digoyang pada kecepatan 36 rpm selama \pm 5 menit sampai pita protein terlihat jelas. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan antara pola protein sampel dengan marka protein yang telah diketahui berat molekulnya.

3.8.8 Pengujian Peredaman Radikal Hidroksil

Pengujian peredaman radikal hidroksil sesuai dengan metode deoksiribosa dengan sedikit modifikasi (Kumar *et al.*, 2013). Larutan sampel dipreparasi dengan konsentrasi sampel 0,0002; 0,002; 0,02; 0,2; 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pengujian dilakukan menambahkan masing-masing sampel dengan FeCl_3 100 μL 10 mM, EDTA 100 μL 1 mM, asam askorbat 50 μL 1 mM, H_2O_2 50 μL 1 mM, buffer fosfat 150 μL 28 mM pH 7,4, deoksiribosa 50 μL 28 mM. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Lalu ditambahkan 400 μL TBA 1% dan 400 μL TCA 2,8% untuk memunculkan warna kromogen merah muda. Tabung reaksi berisi sampel kemudian dipanaskan pada 80°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan dan dibaca absorbansinya pada λ 532 nm. Sebagai pembanding digunakan 2 kontrol positif yaitu dengan penambahan *glutathione* (GSH) dan enzim alkalase bebas. Aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) dinyatakan sebagai persen (%) penghambatan terhadap radikal hidroksil dan IC_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Persen perhitungan dihitung sesuai dengan Persamaan 2.2, dimana A_{kontrol} merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan analisis menggunakan persamaan regresi linier dari besar peredaman (%), dimana nilai IC_{50} menunjukkan besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat radikal hidroksil sebanyak 50%. yang dilanjutkan dengan analisis ANOVA dan *post hoc* LSD.

3.8.9 Kultur dan Isolasi Plasmid DNA

Plasmid DNA yang dipergunakan dalam penelitian ini diperoleh dari hasil isolasi bakteri *Escherichia coli*. Inokulasi koloni tunggal sel bakteri *Escherichia coli* kedalam 3 ml media luria bertani (LB) cair di tabung reaksi tertutup yang

telah disterilkan dengan autoklaf yang mengandung 2 μL ampisilin sebagai antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain. Inkubasi biakan bakteri selama 16 jam dalam *shaker incubator* dalam suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian plasmid DNA diisolasi dengan metode *mini preparation (mini-prep)* (Sambrook & Russell, 2001).

Langkah pertama yang dilakukan dalam mengisolasi yaitu inokulum dipindahkan dalam *microtube* dan sentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh disuspensikan dengan 100 μL larutan I. Suspensi dihomogenkan dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Lalu ditambahkan 100 μL larutan II dan dihomogenkan dengan dibolak-balik (tidak *divortex*). Suspensi kembali diinkubasi dalam es 5 menit. Kemudian ditambahkan 200 μL larutan III. Suspensi dihomogenkan kembali dengan dibolak-balik beberapa kali dan diinkubasi dalam es 5 menit. Suspensi disentrifus 12.000 rpm, 10 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke *microtube* baru lalu ditambahkan 320 μL PCI kemudian disentrifus 12.000 rpm, 10 menit. Supernatan yang dihasilkan selanjutnya ditambahkan natrium asetat sebanyak 10% dari volume awal, kemudian dihomogenkan. Lalu ditambahkan etanol absolut (96%) sebanyak 2x volume awal, dihomogenkan, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Larutan disentrifus 12.000 rpm, selama 5 menit. Supernatan dibuang, sedangkan pelet dicuci dengan penambahan 1 ml alkohol 70%. Larutan dibolak-balik beberapa kali. Larutan kembali disentrifus 12.000 rpm, selama 5 menit. Supernatan dibuang, pelet yang diperoleh dikering-anginkan selama 7-10 menit pada suhu ruang. Kemudian pelet plasmid DNA dilarutkan 40 μL *double distillation water* (ddH₂O). Selanjutnya pengukuran konsentrasi dan kemurnian plasmid DNA dengan *nanodrop*.

3.8.10 Elektroforesis Gel Agarosa 1%

Elektroforesis gel agarosa 1% untuk mengetahui efek proteksi ekstrak protein biji melinjo terhadap kerusakan DNA yang diinduksi radikal hidroksil dari reaksi fenton sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Arnao (2000). Optimasi waktu inkubasi dilakukan berdasarkan waktu 0 menit, 20 menit, dan 40

menit pada suhu 37°C. Pada *microtube*, 0,5 µg plasmid DNA ditambah campuran larutan 30 mM H₂O₂, 50 µM asam askorbat, dan 80 µL FeCl₃. Tambahkan 10 µg sampel Gg-PH dan akuades steril sampai volume akhir 20 µL. Kontrol positif dengan penambahan *glutathione* (GSH). *Loading buffer* ditambahkan pada sampel dengan perbandingan 1:4 sebelum dimasukkan dalam sumur gel agarosa 1%. Gel agarosa dengan pewarnaan etidium bromida dijalankan dalam buffer TBE dengan tegangan 50V selama ± 60 menit sampai terbentuk pita. Setelah elektroforesis selesai, pengamatan pita dilakukan dengan *UV transilluminator* untuk mendeteksi bagian *supercoil* (SC) plasmid DNA dan hasil dicetak menggunakan *gel documentation*.

3.9 Analisis Data

Tujuan derajat hidrolisis untuk melihat bahwa protein isolat biji melinjo berhasil dihidrolisis secara enzimatik dengan menggunakan enzim alkalase terimobilisasi. Hasil absorbansi yang diperoleh dibandingkan dengan standar leusin untuk mengetahui jumlah asam amino. Kemudian total asam amino sampel isolat dan total asam amino sampel terhidrolisis digunakan untuk mengetahui persentase derajat hidrolisis. Hasil derajat hidrolisis yang baik adalah memiliki nilai lebih dari 30% (Himonides *et al.*, 2011).

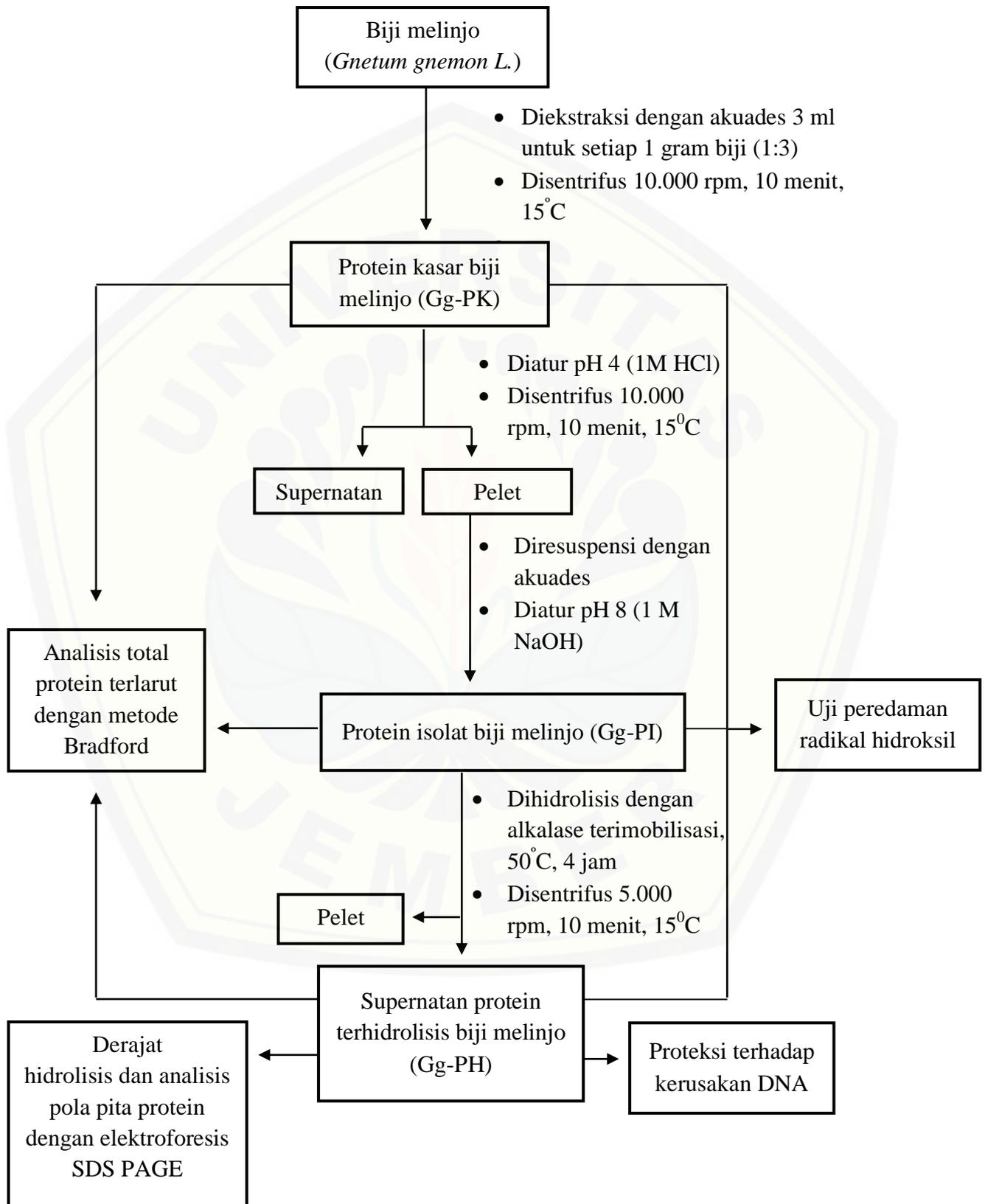
Hasil elektroforesis SDS-PAGE dapat dilihat dari profil pita protein yang diperoleh untuk melihat keberhasilan hidrolisis protein. Masing-masing sampel (protein kasar dan hidrolisat) diamati untuk mengetahui jelas tidaknya pita protein yang terbentuk. Protein dikatakan berhasil terhidrolisis apabila pita protein pada berbagai berat molekul tertentu tidak terlihat jelas (Pace *et al.*, 2004).

Aktivitas antioksidan diperoleh berdasarkan peredaman radikal hidroksil (%). Data nilai absorbansi dari sampel yang diperoleh kemudian dihitung peredaman radikal hidroksil (%) dengan Persamaan 2.2. Selanjutnya data diolah menggunakan analisis menggunakan persamaan regresi linier dari besar peredaman (%), sehingga diperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ digunakan untuk menunjukkan konsentrasi protein yang dibutuhkan untuk meredam radikal hidroksil sebanyak 50%. Setelah diperoleh data IC₅₀, kemudian dilanjutkan

analisis statistik menggunakan uji normalitas dengan $P > 0,05$. Setelah itu dilakukan uji homogenitas. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji statistik *one way ANOVA* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc* tipe LSD untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan secara signifikan. Jika data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan transformasi data dan apabila hasil transformasi tidak normal, maka dilakukan uji non parametrik.

Data yang diperoleh dari hasil elektroforesis gel agarosa dapat dilihat pada pita dengan cara visualisasi DNA. Visualisasi DNA dilakukan dengan menggunakan *UV transluminator*. Parameter pengujian kerusakan DNA berdasarkan plasmid dalam bentuk sirkuler. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan antioksidan pada protein isolat biji melinjo yang terhidrolisis menggunakan enzim alkalase terimobilisasi dalam melindungi DNA dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal hidroksil. Plasmid DNA akan diberikan perlakuan dengan reaksi fenton dan sampel, kemudian dilihat aktivitas penghambatannya yaitu ditunjukkan dengan semakin tebalnya pita *supercoil* plasmid DNA yang terbentuk (Sembodo, 2015).

Skema Penelitian

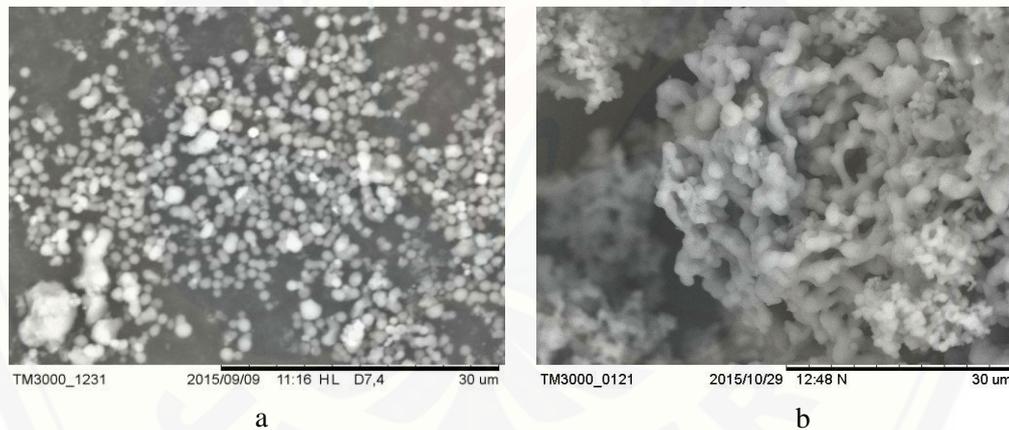


Gambar 3.2 Skema penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakterisasi Imobilisasi Enzim Alkalase

Teknik imobilisasi enzim dilakukan dengan menggunakan metode penjerapan yang disebutkan oleh Reetz *et al.* (2003). Enzim alkalase diimobilisasi menggunakan beberapa campuran bahan pembawa (DMDMOS/TMOS, 1:1) yang mengandung PEG, NaF dan isopropil alkohol. Setelah semua bahan dicampurkan, alkalase gel yang terbentuk kemudian dikeringkan dalam suhu ruangan. Selanjutnya dilakukan karakterisasi morfologi enzim terimobilisasi menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Pada Gambar 4.1 menunjukkan morfologi matriks dan enzim alkalase terimobilisasi dengan perbesaran 3.000 kali.

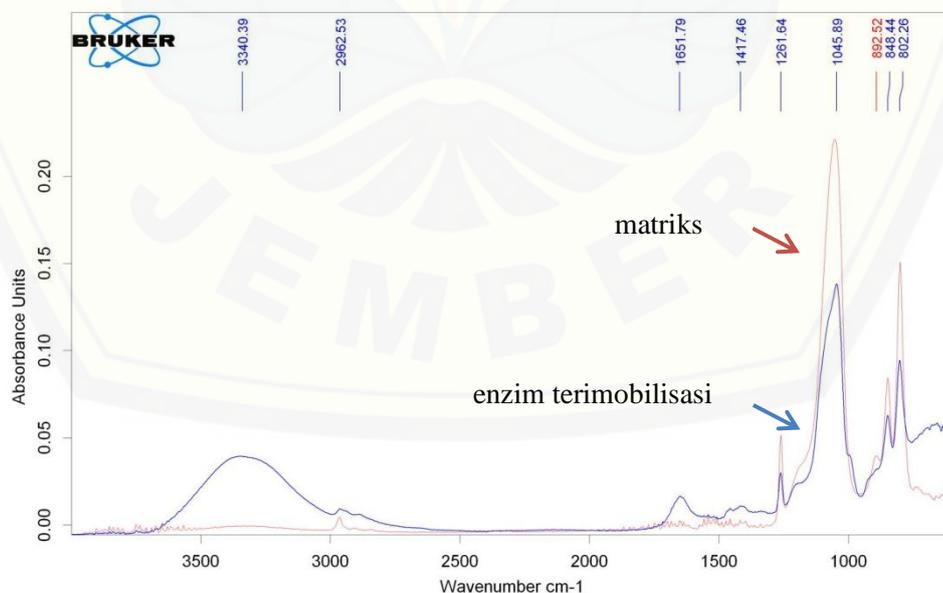


Gambar 4.1 Fotogram SEM dengan perbesaran 3.000 kali; (a) matriks; (b) enzim alkalase terimobilisasi

Perbandingan bentuk fisik antara hasil dari matriks dan enzim alkalase terimobilisasi sangat berbeda dimana pada hasil matriks (a) terlihat berbentuk granular elips dan permukaan yang halus serta adanya jarak antar granul. Sedangkan pada hasil enzim alkalase terimobilisasi (b) berbentuk granul yang tidak beraturan dan saling terikat. Menurut Reetz *et al.* (2003) menyatakan bahwa metode penjerapan pada teknik imobilisasi enzim merupakan metode yang mudah

dilakukan dan terbaik daripada metode lainnya karena dapat meningkatkan aktivitas enzim secara signifikan. Penggunaan silan (DMDMOS/TMOS, 1:1) sebagai matriks menunjukkan nilai peptida yang tinggi serta dapat meningkatkan aktivitas enzim apabila selama proses pembentukan sol-gel digunakan bersama dengan isopropil alkohol (Corici *et al.*, 2011).

Selain melihat karakterisasi morfologi enzim, dilakukan pula karakterisasi komposisi kimia enzim yang dilihat menggunakan spektroskopi *fourier transform infrared* (FTIR). Hasil spektra FTIR pada matriks dan alkalase terimobilisasi dapat ditunjukkan pada Gambar 4.2. Pada Gambar 4.2 menunjukkan perbedaan spektra matriks dan enzim alkalase terimobilisasi. Pada daerah serapan antara $3.000-3.500\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan bahwa spektra matriks memiliki intensitas rendah yang ditandai dengan nilai absorbansi mendekati nol, sedangkan spektra enzim alkalase terimobilisasi memiliki intensitas yang tinggi dengan nilai absorbansi sebesar 0,05. Hal tersebut dapat dikatakan bahwa adanya interaksi antara enzim dengan matriks yang menghasilkan gugus OH, dimana pada daerah serapan antara $3.000-3.700\text{ cm}^{-1}$ merupakan daerah serapan gugus OH yang paling kuat (Gokgoz & Yigitoglu, 2011).



Gambar 4.2 Spektra FTIR matriks dan enzim alkalase terimobilisasi

Pada daerah serapan 1.052 cm^{-1} menunjukkan bahwa spektra matriks memiliki intensitas yang tinggi, sedangkan spektra enzim alkalase terimobilisasi memiliki intensitas yang rendah. Hal tersebut dapat dikatakan bahwa adanya interaksi antara enzim dengan matriks menyebabkan menurunnya gugus eter, dimana gugus eter diketahui merupakan gugus utama dari matriks silan. Hasil dari pembentukan enzim alkalase yang telah terimobilisasi dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Enzim alkalase terimobilisasi

4.2 Ekstraksi dan Isolasi Biji Melinjo

Biji melinjo yang berwarna merah yang dihaluskan, disaring, dan disentrifus menghasilkan protein kasar biji melinjo (Gg-PK). Jumlah total protein kasar (Gg-PK) yang diperoleh dari proses ekstraksi sebanyak 266,43 mg dengan hasil protein biji melinjo awal sebesar 100% (Tabel 4.1). Proses ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan protein dari zat campuran lainnya. Kemudian protein kasar biji melinjo (Gg-PK) diisolasi menggunakan metode presipitasi isoelektrik (Salcedo *et al.*, 2002) yang menghasilkan supernatan yang disebut protein isolat (Gg-PI). Protein isolat (Gg-PI) yang diperoleh sebanyak 136 mg dengan hasil perolehan kembali protein sebesar 51% (Tabel 4.1).

Nilai protein awal (Gg-PK) sebesar 100% diperoleh dari supernatan total hasil ekstraksi biji melinjo yang mengandung protein. Sedangkan penurunan nilai perolehan jumlah protein isolat biji melinjo (Gg-PI) sebesar 51%. Penurunan jumlah protein sebesar 51% dari semula menunjukkan adanya beberapa protein tertentu yang tidak terpresipitasi atau masih larut pada pH 4 saat proses isolasi.

Hal tersebut dapat dimungkinkan karena adanya perbedaan sifat fungsional pada setiap protein yang terkandung pada biji melinjo (Siswoyo, 2006). Presipitasi sebagian protein ini dapat disebabkan karena adanya perubahan konfigurasi protein dimana terjadi peningkatan interaksi antar molekul protein dan interaksi antara molekul protein dan air menurun (Salcedo *et al.*, 2002).

Tabel 4.1 Hasil produksi bertahap protein biji melinjo

Sampel uji	Total protein (mg)	Protein awal (%)
Gg-PK	266,43	100
Gg-PI	136	51
Gg-PH	29,47	22

4.3 Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo dan Penentuan Derajat Hidrolisis

Produksi protein hidrolisat (Gg-PH) dilakukan dengan cara menghidrolisis protein isolat (Gg-PI) menggunakan enzim alkalase terimobilisasi yang menghasilkan protein sebanyak 29,47 mg dengan hasil perolehan kembali protein sebesar 22% (Tabel 4.1). Protein yang dihidrolisis secara enzimatik tersebut menyebabkan Gg-PH memiliki berat molekul lebih rendah daripada Gg-PK dan Gg-PI. Berat molekul yang kecil dapat menghasilkan konsentrasi protein yang tinggi sehingga akan menghasilkan jumlah protein rendah (Zhidong *et al.*, 2013). Pada proses hidrolisis enzimatik terjadi denaturasi protein yang menyebabkan protein mudah dipotong oleh alkalase pada ikatan peptida. Protein dengan berat molekul yang lebih kecil kemudian mengalami renaturasi sehingga adanya interaksi dengan air yang menyebabkan peptida larut dalam air (Muhamyankaka *et al.*, 2013). Namun hidrolisis protein yang terjadi dapat menyebabkan protein yang awalnya tidak larut menjadi protein terlarut yang kemudian dihidrolisis oleh enzim alkalase menjadi asam amino. Oleh karena itu, jumlah protein terlarut dalam biji melinjo selama proses hidrolisis mengalami penurunan. Reagen bradford bereaksi secara spesifik dengan protein, sehingga semakin banyak ikatan peptida yang terhidrolisis maka jumlah ikatan peptida yang terhitung sebagai protein terlarut semakin rendah (Rising, 1930 dalam Anggraini & Yunianta, 2015). Sehingga adanya bagian yang tidak terlarut, beberapa polipeptida yang kurang larut dibandingkan bentuk peptida hasil hidrolisis yang mudah larut serta

adanya peptida yang terdenaturasi menunjukkan hasil pengukuran protein terhidrolisis yang lebih rendah dibandingkan dengan protein isolat (Rachmawati, 2015).

Untuk memantau proses hidrolisis, maka ditentukan derajat hidrolisis (DH) yang sebelumnya telah dilakukan optimasi kondisi hidrolisis. Pada pengukuran ini, diperoleh derajat hidrolisis (%) sebesar 70,33%. Hasil ini menunjukkan bahwa enzim alkalase terimobilisasi mampu menghidrolisis protein isolat biji melinjo (Gg-PI) dengan baik. Proses hidrolisis protein dikatakan baik apabila memiliki nilai derajat hidrolisis yang semakin tinggi. Adanya peningkatan derajat hidrolisis disebabkan oleh peningkatan jumlah peptida dan asam amino akibat pemutusan ikatan peptida selama proses hidrolisis (Hasnaliza *et al.*, 2010). Hidrolisis dikatakan baik jika diperoleh derajat hidrolisis lebih dari 30% (Himonides *et al.*, 2011).

Cara untuk meningkatkan efektivitas penggunaan enzim alkalase terimobilisasi maka dilakukan uji pengulangan penggunaan enzim dengan tujuan untuk mengetahui peluang penggunaan kembali enzim terimobilisasi (Wardoyo *et al.*, 2015). Pada penelitian ini, diketahui bahwa enzim alkalase terimobilisasi dapat digunakan hingga 4 kali pengulangan dalam menghidrolisis protein isolat (Tabel 4.2). Hidrolisis awal diperoleh sebesar 100%. Kemudian terjadi penurunan hidrolisis setelah penggunaan kedua, ketiga dan keempat sebesar 32%, 60% dan 72% dari nilai hidrolisis sebenarnya. Pada proses hidrolisis yang telah dilakukan, enzim alkalase terimobilisasi masih efektif menghidrolisis protein hingga penggunaan ke-4. Adanya penurunan nilai ini disebabkan oleh terjadinya denaturasi enzim terimobilisasi pada matriks silika (Dhini & Febriana, 2010). Penurunan aktivitas enzim berhubungan dengan kestabilan dari daya katalis pada molekul enzim. Hal ini dapat dikatakan adanya perubahan konformasi matriks, dimana saat enzim terimobilisasi digunakan maka akan ada interaksi antara matriks dengan enzim sehingga ketika adanya perubahan enzim maka akan dapat terjadi perubahan matriks pula. Sehingga kemungkinan enzim keluar dari gel pada saat pemakaian (Sebayang, 2006).

Teknik imobilisasi enzim menggunakan metode penjerapan menyebabkan adanya enzim yang terlindungi oleh bahan pendukung (matriks). Enzim alkalase terimobilisasi diketahui memiliki aktivitas dalam menghidrolisis protein isolat sebanyak 4 kali dimana pada pengulangan ke-3 dan ke-4 memiliki nilai selisih penurunan penggunaan enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein lebih besar. Dengan demikian semakin besar selisih penurunan penggunaan enzim, maka semakin kecil efektivitas enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein. Melalui teknik imobilisasi enzim ini, diharapkan dapat menekan biaya penggunaan enzim bebas yang tidak ekonomis (Wardoyo *et al.*, 2015).

Tabel 4.2 Penggunaan kembali enzim terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo

Sampel	Penggunaan enzim (n)	Derajat hidrolisis (%)	Aktivitas enzim (%)	*Selisih penurunan aktivitas enzim (%)
Gg-PH terimobilisasi	1	69,84	100	-
	2	47,48	68	32
	3	27,82	40	60
	4	19,23	28	72

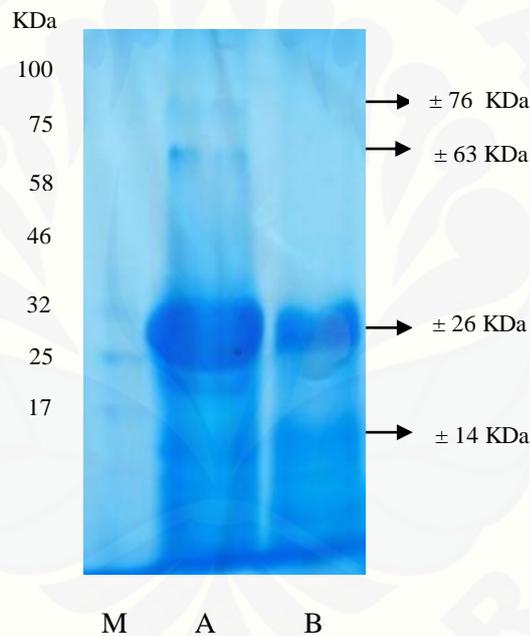
(*) Selisih penurunan aktivitas enzim = aktivitas enzim^(t1) – aktivitas enzim^(tn)
n = nilai penggunaan enzim alkalase terimobilisasi

4.4 Pola Pita Protein Biji Melinjo

Elektroforesis secara umum digunakan untuk analisis kualitatif protein maupun DNA (Langga *et al.*, 2012). Selain dilihat dari derajat hidrolisis (%), keberhasilan hidrolisis protein juga dapat dilihat dari profil proteinnnya. Profil protein biji melinjo dapat dianalisis dengan menggunakan elektroforesis SDS-PAGE. Metode karakterisasi protein dengan menggunakan SDS-PAGE umumnya didasarkan pada berat molekul protein. Hasil SDS-PAGE dan perbedaan pita protein biji melinjo dapat dilihat pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.3.

Pada Gambar 4.4 menjelaskan hasil elektroforesis pada protein biji melinjo Gg-PK dan Gg-PH. Protein dengan berat molekul kecil akan bergerak cepat dalam gel, sedangkan protein dengan berat molekul besar akan tinggal di atas (Sugiharsono *et al.*, 2014). Pada Gg-PK dan Gg-PH hasil elektroforesis SDS-

PAGE tersebut menunjukkan terdapat empat pita protein dengan berat molekul yang berbeda, yaitu 76, 63, 26, dan 14 KDa. Pita protein dengan berat molekul 76, 63, 26 dan 14 KDa yang memudar menandakan bahwa terdapat proses pencernaan enzim alkalase, ditandai dengan perubahan berat molekul yang semakin kecil pada protein karena mengalami proses pemutusan ikatan peptida. Hal tersebut menandakan bahwa protein berhasil dihidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim alkalase terimobilisasi. Hidrolisis ikatan peptida ini akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu dapat meningkatkan kelarutan dan dapat menurunkan berat molekul protein (Pace *et al.*, 2004).



Gambar 4.4 Elektroforesis SDS PAGE. M = Marker, A = Protein Kasar (Gg-PK), B = Protein terhidrolisis (Gg-PH)

Perbedaan profil protein pada sampel di berbagai berat molekul ditunjukkan pada Tabel 4.3. Pada pita protein Gg-PK dengan berat molekul 76 kDa dan 63 kDa tidak terdapat pada protein terhidrolisis, sedangkan pada pita protein dengan berat molekul 26 kDa dan pita protein pada berat molekul 14 KDa hanya terlihat tidak jelas pada protein terhidrolisis. Hal tersebut dapat dikatakan bahwa protein telah terhidrolisis yaitu pada protein dengan berat molekul 76 KDa, 63 KDa, 26 kDa dan 14 KDa.

Tabel 4.3 Perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE biji melinjo

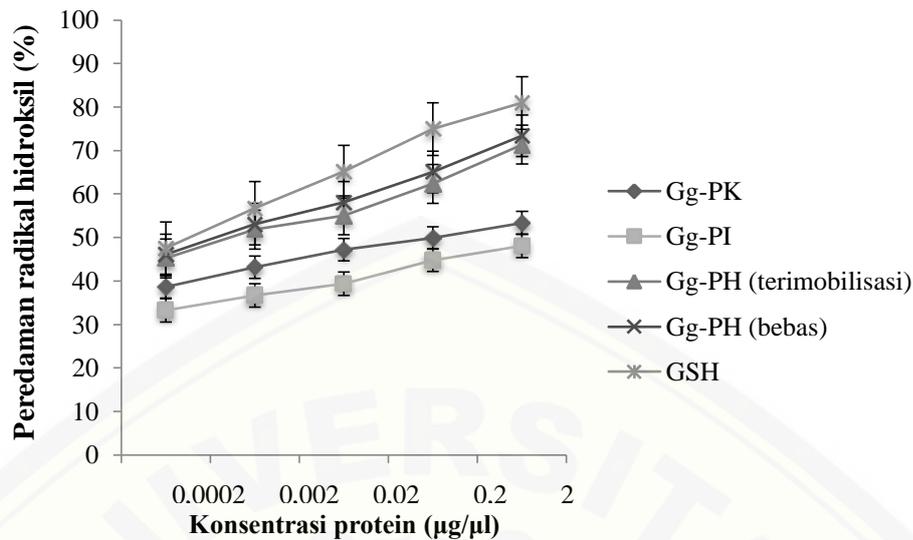
BM	Gg-PK	Gg-PH
± 76 KDa	+	-
± 63 KDa	+	-
± 26 KDa	+++	++
± 14 KDa	++	+

Keterangan : (-) Tidak ada pita
 (+) Ada pita (tidak jelas)
 (++) Ada pita (jelas)
 (+++) Ada pita (sangat jelas)

4.5 Aktivitas Antioksidan Protein Terhidrolisis pada Peredaman Radikal Hidroksil

Penentuan aktivitas antioksidan protein terhidrolisis dalam meredam radikal hidroksil menggunakan metode deoksiribosa (Kumar *et al.*, 2013). Dalam metode ini, terdapat senyawa antioksidan pada protein akan dapat meredam radikal hidroksil yang dihasilkan oleh pereaksi fenton, sehingga jumlah OH• yang berikatan dengan deoksiribosa untuk membentuk malondialdehid sedikit (Nugroho *et al.*, 2006). Profil hubungan antara konsentrasi protein dan peredaman radikal hidroksil (%) disajikan pada Gambar 4.5 yang menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi sampel, maka peredaman radikal hidroksil semakin meningkatkan. Hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh zat antioksidan tersebut (Ulfa *et al.*, 2014). Selain itu, peredaman radikal hidroksil juga dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yang ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Untuk menilai hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya aktivitas penghambatan radikal hidroksil terhadap protein biji melinjo, maka dapat dianalisis menggunakan persamaan regresi linier dari besar peredaman (%) sehingga akan diketahui nilai *inhibition concentration* (IC₅₀).



Gambar 4.5 Profil aktivitas antioksidan pada peredaman radikal hidroksil protein biji melinjo

Tabel 4.4 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kemampuan aktivitas antioksidan protein biji melinjo dalam meredam 50% radikal hidroksil atau dinyatakan dalam nilai IC_{50} . Dari hasil pengujian tersebut, diperoleh nilai IC_{50} menggunakan analisis persamaan regresi linier dari protein kasar (Gg-PK) sebesar $0,3376 \pm 0,0258 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, protein terhidrolisis (Gg-PH) terimobilisasi sebesar $0,0020 \pm 0,0005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, protein terhidrolisis (Gg-PH) bebas sebesar $0,0008 \pm 0,0003 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan GSH sebesar $0,0003 \pm 0,0001 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal hidroksil semakin besar dan sebaliknya (Nugroho *et al.*, 2006). Dapat dilihat dari hasil yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa protein terhidrolisis merupakan protein yang memiliki tingkat peredaman radikal hidroksil lebih efektif dari protein kasar karena protein terhidrolisis memiliki nilai IC_{50} lebih kecil dari protein kasar. Pengukuran nilai IC_{50} tidak dilakukan pada sampel Gg-PI karena hasil peredaman radikal hidroksil yang diperoleh tidak mencapai 50%. Sedangkan hasil peredaman pada protein kasar (Gg-PK) telah mencapai 50% (Gambar 4.5).

Hasil analisis statistik hasil uji *one way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* menunjukkan bahwa kelompok sampel Gg-PH (terimobilisasi) lebih bagus daripada sampel Gg-PK. Sedangkan kelompok sampel Gg-PH tidak

berbeda signifikan terhadap sampel Gg-PH (bebas) maupun terhadap kontrol (GSH). Hal ini dapat dikatakan bahwa protein biji melinjo baik yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi dan bebas memiliki aktivitas yang sama seperti *glutathione* (GSH).

Tabel 4.4 Nilai IC₅₀ protein biji melinjo pada pengujian peredaman radikal hidroksil

Sampel uji	Nilai IC ₅₀ (µg/µl)
Gg-PK	0,3376 ± 0,0258 ^a
Gg-PH (terimobilisasi)	0,0020 ± 0,0005 ^b
Gg-PH (bebas)	0,0008 ± 0,0003 ^b
GSH	0,0003 ± 0,0001 ^b

Data nilai IC₅₀ disajikan dalam rata-rata ± SD (n=3). Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan (LSD, p<0,05).

Pengukuran aktivitas peredaman radikal hidroksil ini ditentukan dengan metode deoksiribosa. Metode ini menggunakan spektrofotometri visibel untuk mengukur produk degradasi deoksiribosa yang disebabkan radikal hidroksil yang dihasilkan oleh reagen fenton. Hasil produk degradasi deoksiribosa yaitu MDA, yang dalam suasana asam akan bereaksi dengan TBA membentuk kromogen berwarna merah muda (kromogen MDA-TBA) yang menyerap maksimum pada λ 532 nm (Kunchandy & Rao, 1990). Adanya senyawa penangkap radikal hidroksil di dalam protein biji melinjo akan menurunkan jumlah MDA sehingga jumlah kromogen MDA-TBA akan berkurang yang ditunjukkan dengan penurunan absorbansi larutan dan intensitas warna yang dihasilkan lebih pudar. Dapat diketahui bahwa MDA merupakan senyawa penanda adanya radikal bebas. Jadi, semakin banyak terbentuk produk MDA maka semakin banyak kerusakan yang terjadi (Moreno, 2002).

4.6 Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Isolat Biji Melinjo Terhidrolisis

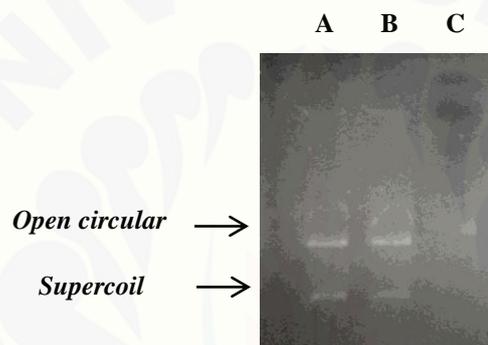
Pengujian terhadap kerusakan DNA bertujuan untuk melihat kemampuan antioksidan yang berasal dari biji melinjo terhidrolisis dalam melindungi DNA dari kerusakan akibat paparan radikal hidroksil melalui reaksi fenton. Tahap

pertama untuk dalam pengujian ini yaitu isolasi plasmid DNA. Metode yang digunakan untuk isolasi plasmid yaitu *mini preparation (mini-prep)* yang telah dijelaskan oleh Sambrook & Russell (2001). Setelah dilakukan isolasi plasmid, kemudian dilanjutkan dengan melihat kemurnian dari plasmid DNA yang diperoleh menggunakan *nanodrop* spektrofotometer. Hasil kemurnian DNA yang diperoleh (A_{260}/A_{280}) sebesar 1,981 dengan konsentrasi plasmid DNA sebesar 0,117 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Dapat dikatakan bahwa plasmid yang diperoleh sudah dalam keadaan murni. Kemudian dilakukan uji proteksi kerusakan DNA menggunakan elektroforesis gel agarosa.

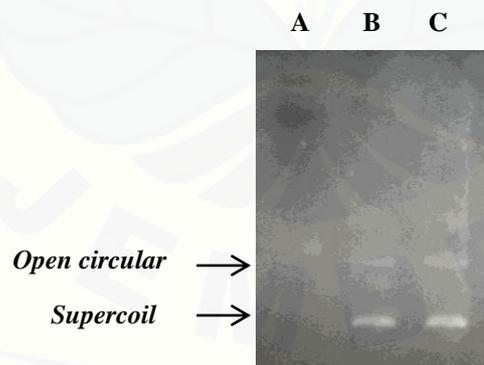
Optimasi waktu inkubasi antara plasmid DNA dan fenton ditunjukkan pada Gambar 4.6. Pada optimasi tersebut dapat dilihat adanya perubahan pita *supercoil* yang menandakan terdapat kerusakan plasmid DNA oleh radikal hidroksil yang berasal dari reaksi fenton. Tebal pita DNA *supercoil* mengalami perubahan seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Semakin lama waktu inkubasi, maka akan semakin lama pula paparan radikal hidroksil terhadap plasmid DNA yang menyebabkan pita *supercoil* (SC) semakin memudar. Maka dipilih waktu inkubasi 40 menit. Radikal hidroksil menyebabkan pita *supercoil* pada plasmid DNA akan berubah struktur menjadi *open circular* yang ditandai dengan pemudaran pada semua pita plasmid (You *et al.*, 2002). Hal ini dapat diartikan bahwa DNA merupakan target dari kerusakan oksidasi yang diperantarai oleh ROS yaitu radikal hidroksil (Martinez *et al.*, 2003).

Penambahan protein terhidrolisis (Gg-PH) biji melinjo pada plasmid DNA dengan perbandingan 1:20 memberikan gambaran pita *supercoil* yang lebih tebal dibandingkan dengan plasmid yang tidak diberi protein terhidrolisis (Gg-PH) dengan waktu inkubasi yang sama. Hal tersebut menandakan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal hidroksil sama dengan kontrol positif (GSH) serta dapat melindungi kerusakan DNA dan kemampuan Gg-PH dalam menghambat kerusakan plasmid DNA berhubungan dengan hasil pengukuran pada peredaman radikal hidroksil (Gambar 4.7). Penambahan protein biji melinjo terhidrolisis pada plasmid DNA yang telah dilakukan oleh Siswoyo *et al.*, (2013) dengan perbandingan 1:40 dan 1:30

(Sembodo, 2015) mampu melindungi kerusakan DNA akibat radikal hidroksil. Hal ini dapat dikatakan bahwa penambahan protein biji melinjo terhidrolisis pada plasmid DNA dengan perbandingan 1:20 sudah dapat menghambat kerusakan pada DNA. Penghambatan perubahan pita *supercoil* DNA yang disebabkan oleh adanya reaksi dengan radikal hidroksil terjadi melalui dua mekanisme, yaitu mekanisme katalis protein pada ion Fe^{2+} sehingga dapat menghambat terjadinya peruraian H_2O_2 menjadi OH^- dan OH^\bullet serta besarnya kapasitas protein terhidrolisis yang dapat berikatan dengan dengan OH^\bullet hasil dari reaksi fenton (Yu *et al.*, 2015).



Gambar 4.6 Optimasi waktu inkubasi pada DNA plasmid. Plasmid DNA+ fenton selama 0 menit (A), 20 menit (B), 40 menit (C)



Gambar 4.7 Efek proteksi protein biji melinjo terhidrolisis pada DNA plasmid.
 A : Plasmid DNA + fenton selama 40 menit (kontrol negatif)
 B : Plasmid DNA + fenton + Gg-PH (enzim terimobilisasi) (40 menit)
 C : Plasmid DNA + fenton + GSH (kontrol positif) (40 menit)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa penggunaan enzim alkalase terimobilisasi berhasil menghidrolisis protein yang dapat dilihat dari nilai derajat hidrolisis dan profil pita protein. Selanjutnya,

penggunaan enzim terimobilisasi digunakan untuk penentuan peredaman radikal hidroksil dan proteksi terhadap kerusakan DNA. Hasil yang diperoleh ternyata tidak jauh berbeda dengan penggunaan enzim bebas yang dilihat dari nilai IC_{50} pada peredaman radikal hidroksil. Gg-PH terimobilisasi juga diketahui memiliki peredaman radikal hidroksil sama dengan GSH yang diketahui merupakan pembanding dalam penentuan aktivitas antioksidan serta dapat terbukti dari hasil proteksi terhadap kerusakan DNA dengan metode yang sama. Protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) menggunakan alkalase terimobilisasi ini memiliki aktivitas penghambatan kerusakan plasmid yang efektif dengan pembentukan kembali pita *supercoil*. Hal ini sesuai dengan pengujian peredaman radikal hidroksil, yang menyatakan bahwa Gg-PH mempunyai penghambatan yang efektif dibandingkan dengan protein kasar dan protein isolat. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menyatakan bahwa protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase bebas memiliki aktivitas antioksidan. Namun alkalase bebas hanya dapat digunakan sekali perlakuan. Sedangkan pada penelitian ini menggunakan enzim alkalase terimobilisasi yang dapat digunakan secara berulang dan lebih hemat biaya.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang telah dilakukan adalah:

- a. Protein biji melinjo (Gg-PH) terhidrolisis menggunakan alkase terimobilisasi memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dalam meredam radikal hidroksil dibandingkan protein kasar dan protein isolat yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar $0,0020 \pm 0,0005 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- b. Protein isolat biji melinjo terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi dengan perbandingan 1:20 (plasmid DNA : protein) mampu memproteksi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara in-vivo dari biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis menggunakan alkalase terimobilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriza, D. 2013. The effect of Mercury Vapor & the Role of Green Tea Extract on Brain Cells. *Journal of Dentistry Indonesia*, 20: 39-45.
- Anggraini, A. & Yunianta. 2015. Pengaruh Suhu dan Lama Hidrolisis Enzim Papain Terhadap Sifat Kimia, Fisika dan Organoleptik Sari Edamame. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3: 1015-1025.
- Arnao, M. B. 2000. Some Methodological Probles in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radical : a Practical Case. *Trends in Food Science Technolgy*, 11: 419-421.
- Astuti, S. 2008. Isoflavon Kedelai & Pontensinya sebagai Penangkap Radikal Bebas. *Jurnal Teknologi Industri & Hasil Pertanian*, 13: 126-136.
- Barua, C. C., Haloi, P. & Barua, I. C. 2015. *Gnetum gnemon* Linn. : A Comprehensive Review on its Biological, Pharmacological & Pharmacological & Pharmacognostical Potensials. *International Journal of Pharmacognosy & Phytochemical Research*, 7: 531-539.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. & Lalitha, R. G. 2008. Optimation of Enzymaic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*) for Preparing Protein Hydrolysate Using a Commercial Protease. *Bioresource Thecnology*, 99: 335-343.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid & Sensitive Methode for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Brookes, M. 2005. *Genetika*. Jakarta: Erlangga.
- Brown, T, A. 2010. *Gene Cloning & DNA Analysis an Introduction Sixth Edition*. USA: Blackwell.
- Corici, L. N., Frissen, A. E., Zoelen, D. J. V., Eggen, I. F., Peter, F., Davidescu, C. M. & Boeriu, C. G. 2011. Synthesis of Peptide Amides Using Sol-Gel Immobilized Alcalase in Batch & Continuous Reaction System. *World Academy of Science, Engineering & Technology*, 5: 823-828.

- Dhini, W. S. U. & Febriana, Y. 2010. Immobilisasi Enzim GOD/HRP untuk Aplikasi Biosensor dengan Metode Sol-Gel. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Industri Institut Teknologi Sepuluh Nopember.
- Dumitriu, S. 2002. *Polymeric Biomaterials*. Canada: Marcel Dekker.
- Dwijoseputro. 2003. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Djembatan.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins & Peptides. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 48: 430–441.
- Elnashar, M. M. M. 2010. Immobilized Molecules Using Biomaterials & Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials & Nanobiotechnology*, 1: 61-77.
- Faatih, M. 2009. Isolasi & Digesti DNA Kromosom. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 10: 51-67.
- Febriani, K. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak & Fraksi Daun *Cocculus orbiculatus* L. dengan Metode DPPH & Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif. *Skripsi*. Fakultas MIPA Universitas Indonesia.
- Fatchiyah, Widyarti, S., Arumingtyas, E. L. & Rahayu, S. 2011. Biologi Molukuler. *Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Erlangga.
- Gaffar, S. 2007. *Buku Ajar Bioteknologi Molekul*. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Gokgoz, M. & Yigitoglu, M. 2011. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to Modified Carboxymethylcellulose or Production of Ethanol. *Springer*, 34: 849-857.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology & Medicine*. (Third Edition). New York: Oxford University.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. & Aruoma, O.I. 1987. The Deoxyribose Method: A Simple “Test Tube” Assay for Determination of Rate Constant for Reaction of Hydroxyl Radicals. *Analytical Biochemistry*, 165: 215-219.
- Halliwell, B. & Whitman, M. 2004. Measuring Reactive Species & Oxidative Damage in Vivo & in Cell Culture. *British Journal of Pharmacology*, 142: 231-255.
- Hanafiah, M. & Allza, D. 2013. Identifikasi Protein Immunogenik Takizoit & Bradizoit *Toxoplasma gondii* Strain Lokal untuk Pengembangan KIT Diagnostik. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7 (1): 21-25.

- Handjani, A., Roosihermatie, B. & Maryani, H. 2009. Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Pola Kematian pada Penyakit Degeneratif di Indonesia. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*, 13: 42-53.
- Harliansyah, 2001. Mengunyah Halia Menyah Penyakit. *Paksi Jurnal*. 92-97.
- Hartati, I. & Kurniasari, L. 2010. Kajian Produksi Kolagen dari Limbah Sisik Ikan Secara Ekstraksi Enzimatis. *Momentum*, 6 (1): 33-35.
- Hasnaliza, H., Maskat, M., Aida, W. W. M. & Mamot, S. 2010. The Effect of Enzyme Concentration, Temperature & Incubation Time on Nitrogen Content & Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. *International Food Research Journal*, 17: 147-152.
- Himonides, A. T., Taylor, A. K. D. & Morris, A. J. 2011. A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Model System. *Food & Nutrition Sciences*, 2: 575-585.
- Hwang, E. S. & Bowen, P. E. 2010. DNA Damage, a Biomarker of Carcinogenesis: Its Measurement & Modulation by Diet & Environment. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 47: 27-50.
- Indrawati, L., Werdbasari, A. & Yudi, A. 2009. Hubungan Pola Kebiasaan Konsumsi Makanan Masyarakat Miskin dengan Kejadian Hipertensi di Indonesia. *Media Penelitian & Pengembangan Kesehatan*, 19: 174-184.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A. & Prior, R. L. 1999. Antioxidant Capacity, Vitamin C, Phenolics, & Anthocyanins after Fresh Storage of Small Fruits. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 47: 4638-4644.
- Kasai, H. 1997. Analysis of a Form of Oxidative DNA Damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a Marker of Cellular Oxidative Stress During Carcinogenesis. *Mutation Research*, 387: 147-163.
- Katzir, E. K. 1993. Immobilized enzyme : Learning from Past Successes & Failures. *Departement of Membrane Research & Biophysics*, 11: 471-478.
- Kementerian Kesehatan RI. 2012. *Jendela Datan & Informasi Kesehatan*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Kumar, A. & Garg, S. 2002. *Immobilization of Enzymes & Biotechnological Perspective*. New Dehli: International Publishing House.
- Kumar, G. P., Navya, A. & Grace, K. 2013. DNA Damage Protecting & Free Radical Scavenging Properties of *Terminalia arjuna* in PC-12 Cells & Plasmid DNA. *Journal of Free Radical & Antioxidant*, 3: 35-39.

- Kunchandy, E. & Rao, M. N. A. 1990. Oxygen Radical Scavenging Activity of Curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 58: 237-240.
- Kristinsson, H.G. 2007. Aquatic Food Protein Hydrolysates. In *Maximising the Value of Marine by-Products*, ed. F. Shahidi. Cambridge: Woodhead.
- Laemmli. 1970. *Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis & Proteomics of Cerebrospinal Fluid*. Vrije Universiteit Amsterdam.
- Langga, I. F., Restu, M. & Kuswinanti. 2012. Optimalisasi Suhu & Lama Inkubasi Dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitti (*Vitex cofassus* Reinw) Serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik RAPD-PCR. *Journal Sain & Teknologi*, 12: 265-276.
- Lingga, L. 2012. *The Healing Power of Antioxidant*. Jakarta: PT Elex Media
- Louis, J. L., Brunschwig, C., Saout, M., Martial, K., Vulcain, E., Bereau, D. & Robinson, J. C. 2014. Optimization of a DNA Nicking Assay to Evaluate *Oenocarpus bataua* & *Camellia sinensis* Antioxidant Capacity. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 18023-18039.
- Lu, J. M., Lin, P. H., Yao, Q. & Chen, C. 2010. Chemical & Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches & Model Systems. *Journal Cellular & Molecular Medicine*, 14: 840-860.
- Marks, D. B., Marks, A. D. & Smith, C. M. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta: ECG.
- Martinez, G., Loureiro, A., Marques, S., Miyamoto, S., Yamaguchi, L., & Onuki, J. 2003. Oxidative Damage in DNA. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 115-127.
- Matra, N. F. 2016. Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Menggunakan Alkalase Terimobilisasi & Aktivasinya sebagai Antihipertensi. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Meyers, J. A., Sanchez, D., Elwell, L. P. & Falkow. S. 1976. Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the identification & Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Bacteriology*, 127: 1529-1537.
- Miyake, T. & Shibamoto, T. Antioxidative Activities of Natural Compounds Found in Plants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 45: 1819-1822.
- Moreno, S. 2002. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Schi Tech Int*, 8: 121-137.

- Muhamyankaka, V., Shoemaker, C. F., Nalwoga, M. & Zhang, X. M. 2013. Physicochemical Properties of Hydrolysates from Enzymatic Hydrolysis of Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Protein Meal. *International Food Research Journal*, 20: 2227-2240.
- Muhilal. 1991. *Teori Radikal Bebas dalam Gizi & Kedokteran*. Bogor: PT Kalbe Farma.
- Murray, R., Granner, D. & Rodwell, V. *Biokimia Harper Ed. 27*. Terjemahan oleh Brahm U. P. 2009. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Nielsen, S. 2001. *Introduction of Food Analysis* dalam S. Nielsen (Ed.). 2010. *Food Analysis Third Edition*. New York: Plenum.
- Nisha, K. & Deshwal R. K. 2011. Antioxidant & Their Protective Action Against DNA Damage. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3: 28-32.
- Nissen, J. A. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 27: 1256-1262.
- Nugroho, A. E., Yuniarti, N., Estyastono, E. P., Supardjan. & Hakmin, L. 2006. Determination of Antioxidant Activity of Dehydrozingeron Through Hydroxy Radical Scavengers Using Deoxyribose Method. *Majalah Farmasi Indonesia*, 17: 116-122.
- Nugroho, E. D. & Rahayu, D. A. 2016. *Penentuan Praktikum Bioteknologi*. Yogyakarta: CV Budi Utama.
- Nurfadillah, Z. A E. 2016. Aktivitas Fraksi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Terhidrolisis Terhadap Radikal Hidroksil Secara *In-Vitro*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Pace, C. N., Trevino, S., Prabhakaran, E. & Scholtz, J. M. 2004. Protein Structure, Stability & Solubility in Water & Other Solvents. *Phil. Sac. Land*. The Royal Society.
- Poland, D. & Scheraga, H.A. 1970. *Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers*. New York: Acamedica Press.
- Prasetyo, M. N., Sari, N. & Budiyati, C. S. 2012. Pembuatan Kecap dari Ikan Gabus Secara Hidrolisis Enzimatis Menggunakan Sari Nanas. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 1: 270-276.

- Purwanto, M. G. M. 2014. Perbandingan Analisa Kadar Protein Terlarut dengan Berbagai Metode Spektroskopi UV-Visible. *Jurnal Ilmiah Sains & Teknologi*, 7: 1-71.
- Rachmawati, A. I. B. 2015. Uji Efektivitas Protein Hidrolisat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebahai Agen Antibakteri. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Reddy, P. R. & Raju, N. 2012. *Gel Electrophoresis & Its Applications*. India: InTech.
- Reetz, M. T., Tielmann, P., Wiesenhofer, W., Konen, W. & Zonta, A. 2003. Swcond Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. *Adv. Synth. Catal*, 345: 717-728.
- Safyudin & Subandrate, 2015. Kadar *glutathione* (GSH) darah karyawan SPBU di Kota Palembang. *Jurnal kedokteran & kesehatan*, 2 (3): 277-281.
- Salcedo-Chavez, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Dominguez, J. & Paredes-Lopez, O. 2002. Optimization of the Isoelectric Precipitation Method to Obtain Protein Isolates from Amarant (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6515-6520.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2006. The Condensed Protocols from *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sangeetha, K., Morris, V. B. & Abraham, T. E. 2008. Stability & Catalytic Properties of Encapsulated Subtilisin in Xerogels of Alkoxisilanes. *Applied Catalysis A: General*, 341: 168-173.
- Sattayasi, N. 2012. *Protein Purification*. Thailand : InTech.
- Sebayang, F. 2006. Pengujian Stabilitas Enzim Bromelin yang Diisolasi dari Bonggol Nanas Serta Imobilisasi Menggunakan Kappa Karagenan. *Jurnal Sains Kimia*, 10:20-26.
- Sediaoetama, A. D. 2010. *Ilmu Gizi I*. Jakarta : PT Dian Rakyat.
- Sembodo, T.A. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Secara In Vitro & Kemampuan Proteksi Terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Sie, J. O. 2013. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* Linn.) Hasil Pengadukan dan Reflux. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 2: 1-10.

- Siswoyo, T. A. 2006. Effect of Sodium Chloride on Thermal Properties of 30 kDa Protein Isolated from Melinjo Seed. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 17: 214-220.
- Siswoyo, T. A., Aldino, M., Ningsih, W. & Okviandri, P. 2007. *Isolasi Protein Antioksidan Dari Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.)*. Jember : Pusat Penelitian Biologi Molekul & Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
- Siswoyo, T. A., Mardiana, E., Lee K.O. & Hoshokwa, K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Seeds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 59: 5648-5656.
- Siswoyo, T. A. & Sugiharto, B. 2012. Produksi Pengembangan Protein Antihypertensi Generasi Baru dari *Gnetum gnemon* Protein sebagai Bahan Nutraceutical Komersial. *Prosiding InSINas*. 217-222.
- Siswoyo, T. A. 2014. Scavenging Hydroxyl Radical Activity & DNA Damage Protective Effect of Hydrolyzed Protein Isolate From Melinjo Seed (*Gnetum gnemon*). *International Seminar APPA*. Jeju, Korea.
- Siswoyo, T. A., Restanto, D. P. & Handoyo, T. 2013. Produksi Pengembangan Protein Antioksidan Generasi Baru dari *Gnetum gnemon* Protein sebagai Bahan Nutraceutical Komersial. [https://www.researchgate.net/publication \[27 Februari2016\]](https://www.researchgate.net/publication/[27%20Februari2016]).
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sugiharsono, C. A., Dewanti, R. & Sulistyani, E. 2014. Analisis Profil Protein Ekstrak Biji Mimba (*Azadirachta Indica A. Juzz*) dengan Pemanasan Basah sebelum Ekstraksi melalui Metode SDS-PAGE. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*.
- Sunarto, H. 1991. *Budidaya Melinjo & Usaha Produksi Emping*. Yogyakarta: Kanisius.
- Swastika, A., Mufrod. & Purwanto. 2013. Antioxidant Activity of Cream Dosage Form of Tomato Extract (*Solanum lycopersicum L.*). *Traditional Medicine Journal*, 18: 132-140.
- Tampubolon, W. 2013. *Badan Penerbitan Tanaman Hutan*. Makasar: BPTH.
- Tjitrosoepomo, G. 2004. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta)*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

- Triyono, A. 2010. Mempelajari Pengaruh Penambahan Beberapa Asam pada Proses Isolasi Protein Terhadap Tepung Protein Isolat Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus L.*). *Seminar Rekayasa Kimia & Proses*. ISSN: 1411-4216.
- Ulfa, F. S., Anggo, A. D. & Romadhon. 2014. Uji Potensi Aktivitas Antioksidan dengan Metode Ekstraksi Bertingkat Pada Lamun Dugong (*Thalassia Hemprichii*) dari Perairan Jepara. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 3: 32-39.
- You, J. H., Oh D. H., Choi, C. Y., Lee, D. G., Hahm, K. S., Moon, A. R. & Jeong, H. G. 2002. Protective Effect Of Metallothionein-III On DNA Damage In Response To Reactive Oxygen Species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1573: 33– 38.
- Yuwono, T. *Biologi Molekular*. Jakarta : Erlangga.
- Yu, Xiao, Lixia Wang, Xing Rui, Wei Li, Xiahong Chen, Mei Jiang, and Mingsheng dong. 2015. Enhancement of the Antioxidant Capacity of Soy Whey by Fermentation with *Lactobacillus plantarum* B1-6. *Journal of Functional Food*.
- Wahdaningsih, S., Setyowati, E. P. & Wahyuono, S. 2011. Free Radical Scavenging Activity of *Alsophila glauca* J. Sm. *Majalah Obat Tradisional*, 16: 156-160.
- Walsh, G. 2002. *Proteins : Biochemistry and Biotechnology*. Ireland: University of Limerick.
- Wardoyo, F. A., Raharjo, T. K. & Swasono, R. T. 2015. Uji Stabilitas Enzim Lipase Terimobilisasi pada Kitosan Serbuk Melalui Teknik Taut Silang. *The Second University Research Coloquim*. 254-259.
- Winarsih, H. 2007. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Windono, T., Soediman, S., Yudawati, U., Ermawati, E. & Srielita, E. T. I. 2001. *Uji Peredaman Radikal Bebas Terhadap 1,1-Diphenyl-2Picrylhydrazyl (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah & Biji Anggur (Viti vinifera L.) Probolinggo Biru & Bali*. *Artocarpus*. 1: 34-43.
- Wirahadikusumah. 1985. *Biokimia : Metabolisme Energi, Karbohidrat & Lipid*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- World Health Organization. 2014. *Chronic Diseases & Health Promotion*. Jenewa: World Health Organization.

Zhidong, L., Benheng, G., Xuezhong, C., Yun,D., Hongliang, H., & Wen. R. 2013. Optimisation of Hydrolysis Conditions for Antioxidant Hydrolysate Production from Whey Protein Isolates Using Respone Surface Methodology. *Agric. Food Res.*, 52: 53-65.



LAMPIRAN

Lampiran A. Komposisi Bahan yang Digunakan

1. Komposisi buffer fosfat pH 8

0,2 M NaH ₂ PO ₄	5,3 mL
0,2 M Na ₂ HPO ₄	94,7 mL
Akuades	sampai 200 mL
2. Komposisi SDS-PAGE
 - a. *Separating gel*

Akrilamida	3,34 mL
1,5 M Tris-HCL pH 6,8	1,66 mL
TEMED	3,4 µL
10% SDS	6,6 µL
APS	2 µL
H ₂ O	16 mL
 - b. *Stacking gel*

Akrilamida	0,5 mL
0,5 M Tris-HCL pH 6,8	0,74 mL
TEMED	3 µL
SDS 10%	30 µL
APS	2 µL
H ₂ O	1,7 mL
 - c. Stok sampel buffer

0,5 M Tris-HCL pH 6,8	1,2 mL
Gliserol	1 mL
SDS 10%	2 mL
<i>Bromofenol Blue</i> 0,5%	0,5 mL
Akuades	4,8 mL

- d. *SDS-reducing buffer*
- | | |
|--------------------|------------|
| 2-merkaptoetanol | 50 μ L |
| Stok sampel buffer | 0,95 mL |
- e. *Running buffer*
- | | |
|-------------------|---------------|
| 0,025 M Tris base | 0,3 g |
| 0,192 M Glisin | 1,4 g |
| SDS 0,1% (w/v) | 1 mL |
| Akuades | sampai 100 mL |
- f. Larutan *staining*
- | | |
|-------------|---------------|
| CBB R-250 | 0,1 g |
| Metanol | 40 mL |
| Asam asetat | 10 mL |
| Akuades | sampai 100 mL |
- g. Larutan *destaining*
- | | |
|-------------|---------------|
| Metanol | 40 mL |
| Asam asetat | 10 mL |
| Akuades | sampai 100 mL |
3. Komposisi larutan Luria Bertani cair pH 7,4
- | | |
|---------|---------------|
| Tripton | 1 g |
| NaCl | 1 g |
| Yeast | 0,5 g |
| Akuades | sampai 100 mL |
4. Komposisi gel agarosa 1%
- | | |
|-----------------|-----------|
| TBE | 25 mL |
| Agarose L | 0,25 g |
| Etidium bromida | 2 μ L |
5. Komposisi bahan isolasi *Mini preparation*
- a. Larutan I
- | | |
|--------------------|-------|
| 50 mM Glukosa | 10 mL |
| 25 mM Tris-Cl pH 8 | 5 mL |
| 10 mM EDTA pH 8 | 4 mL |

b. Larutan II

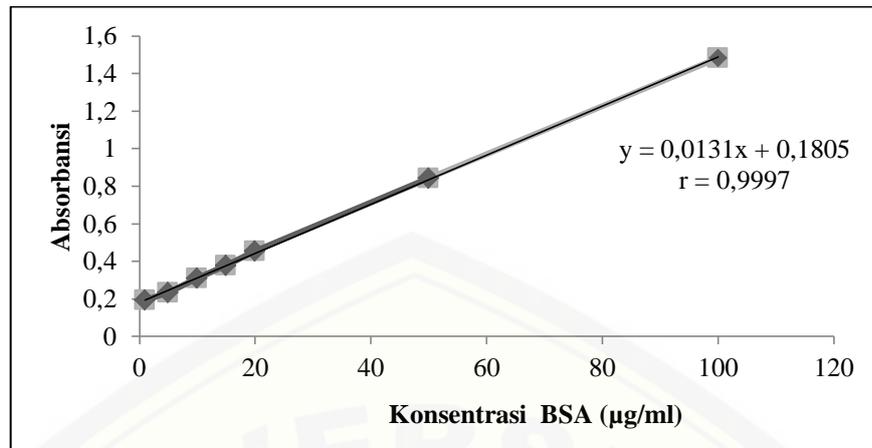
0,5 N NaOH	10 mL
1% SDS	2 mL
ddH ₂ O	8 mL

c. Larutan III

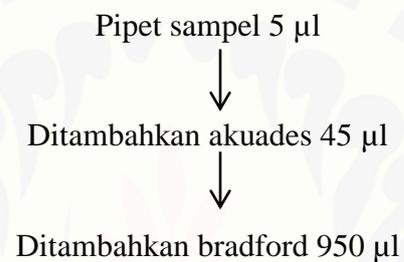
5 M potassium asetat	15 mL
Asam asetat glasial	3,5 mL
ddH ₂ O	11,5 mL

d. PCI

0,1 M Tris-Cl pH 8	5 mL
Phenol	7,5 mL
Chloroform	7,2 mL
Isoamyl alkohol	300 μ L



Preparasi sampel:



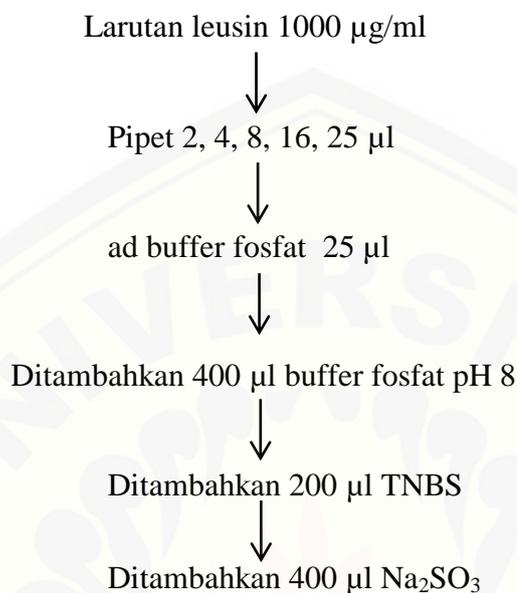
B.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut

Sampel	Absorbansi			Konsentrasi (µg/µl)			Rata-rata (µg/µl)	Stdev (%)	Volume (mL)	Total protein rata-rata (mg)
Gg-PK	0,585	0,599	0,604	6,176	6,389	6,466	6,344	0,150	42	266,43
Gg-PI	0,682	0,609	0,657	7,656	6,542	7,275	7,158	0,566	19	136,00
Gg-PH	0,358	0,354	0,356	2,710	2,649	2,679	2,679	0,031	11	29,47

Lampiran C. Perhitungan Derajat Hidrolisis

C.1 Standar L-Leusin untuk Penentu Derajat Hidrolisis

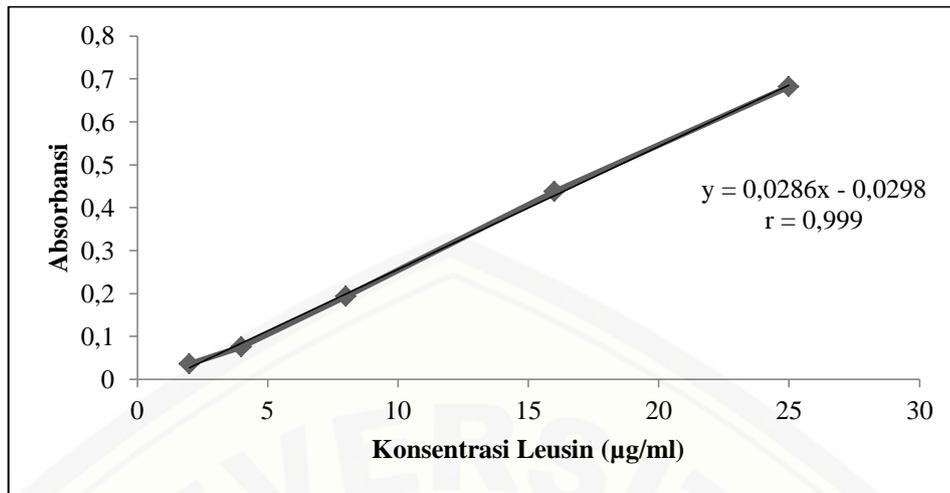
Preparasi standart L-leusin:



M1 (konsentrasi larutan induk) ($\mu\text{g/ml}$)	V1 (volume larutan induk) (μl)	M2 (konsentrasi pengenceran pertama) ($\mu\text{g/ml}$)	V2 (volume pengenceran pertama) (μl)	M3 (konsentrasi akhir uji) ($\mu\text{g/ml}$)	V3 (konsentrasi akhir uji) (μl)
1000	2	80	25	2	1025
1000	4	160	25	4	1025
1000	8	320	25	8	1025
1000	16	640	25	16	1025
1000	25	1000	25	25	1025

Kurva standar L-Leusin

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbansi
2	0,036
4	0,076
8	0,193
16	0,438
25	0,682



Preparasi sampel:

Pipet sampel Gg-PH 5 µl



Ditambahkan 400 µl buffer fosfat pH 8



Ditambahkan 200 µl TNBS



Ditambahkan 400 µl Na₂SO₃

C.2 Hidrolisis Total Gg-PH

Sampel	Absorbansi			Asam amino (µg/µl)			Derajat Hidrolisis (%)	Rata-rata (%)			Stdev (%)
Gg-PH	0,659	0,660	0,624	4,817	4,824	4,572	100	100	100	100	0,000

C.3 Hidrolisis Optimal Gg-PH

Sampel	Absorbansi			Asam amino (µg/µl)			Derajat Hidrolisis (%)			Rata-rata (%)	Stdev (%)
Gg-PH	0,447	0,443	0,449	3,334	3,306	3,348	69,22	68,54	73,23	70,33	0,025

C.4 Hidrolisis Berulang Gg-PH

Penggunaan ke-	Absorbansi			A-amino ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			Derajat Hidrolisis (%)			Rata-rata (%)	Stdev (%)
1	0,445	0,437	0,447	3,320	3,264	3,334	68,93	67,67	72,93	69,84	0,027
2	0,292	0,292	0,291	2,250	2,250	2,243	46,72	46,65	49,07	47,48	0,014
3	0,161	0,162	0,153	1,334	1,341	1,278	27,70	27,81	27,96	27,82	0,001
4	0,102	0,095	0,104	0,922	0,873	0,936	19,13	18,09	20,46	19,23	0,012



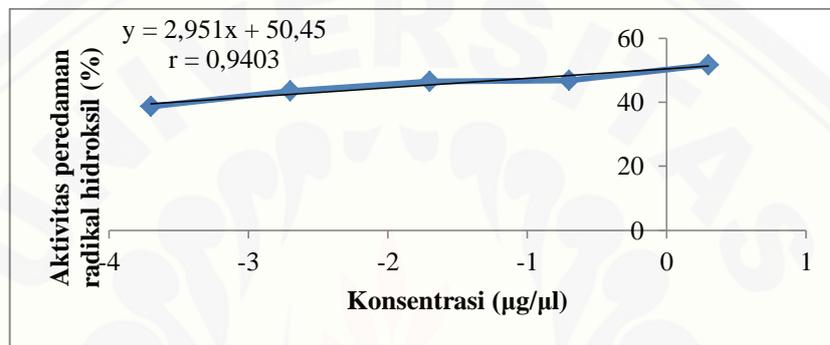
Lampiran D. Perhitungan Peredaman Radikal Hidroksil

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Absorbansi			Peredaman (%)			Rata-rata (%)	Stdev (%)
Kontrol		0,385	0,455	0,445				0,428	
Gg-PK	0,0002	0,263	0,265	0,260	38,60	38,13	39,30	38,68	0,006
	0,002	0,242	0,233	0,255	43,50	45,60	40,47	43,19	0,026
	0,02	0,229	0,218	0,231	46,54	49,11	46,07	47,24	0,016
	0,2	0,219	0,214	0,210	48,87	50,04	50,97	49,96	0,011
	2	0,207	0,191	0,201	51,67	55,41	53,07	53,39	0,019
Gg-PI	0,0002	0,302	0,285	0,270	29,49	33,46	36,96	33,31	0,037
	0,002	0,273	0,271	0,269	36,26	36,73	37,20	36,73	0,005
	0,02	0,250	0,267	0,262	41,63	37,67	38,83	39,38	0,020
	0,2	0,229	0,241	0,239	46,54	43,74	44,20	44,82	0,015
	2	0,229	0,221	0,217	46,54	48,40	49,34	48,09	0,014
Gg-PH (terimo bilisasi)	0,0002	0,242	0,238	0,224	45,50	44,44	47,70	45,88	0,022
	0,002	0,206	0,203	0,210	51,91	52,61	50,97	51,83	0,008
	0,02	0,197	0,193	0,187	54,01	54,94	56,34	55,10	0,012
	0,2	0,166	0,162	0,156	61,25	62,18	63,58	62,33	0,012
	2	0,126	0,122	0,120	70,58	71,52	71,98	71,36	0,007
Gg-PH (bebas)	0,0002	0,233	0,233	0,227	45,60	45,60	47,00	46,07	0,008
	0,002	0,208	0,201	0,194	51,44	53,07	54,71	53,07	0,016
	0,02	0,185	0,181	0,172	56,81	57,74	59,84	58,13	0,016
	0,2	0,152	0,147	0,150	64,51	65,68	64,98	65,06	0,006
	2	0,116	0,112	0,114	72,92	73,85	73,39	73,39	0,005
GSH	0,0002	0,231	0,226	0,217	46,07	47,24	49,34	47,55	0,017
	0,002	0,194	0,182	0,179	54,71	57,51	58,21	56,81	0,019
	0,02	0,155	0,143	0,150	63,81	66,61	64,98	65,14	0,014
	0,2	0,103	0,112	0,107	75,95	73,85	75,02	74,94	0,011
	2	0,089	0,081	0,075	79,22	81,09	82,49	80,93	0,016

Lampiran E. Perhitungan Nilai IC₅₀ dan Analisis Data Statistik

E.1 Nilai IC₅₀ Gg-PK replikasi 1

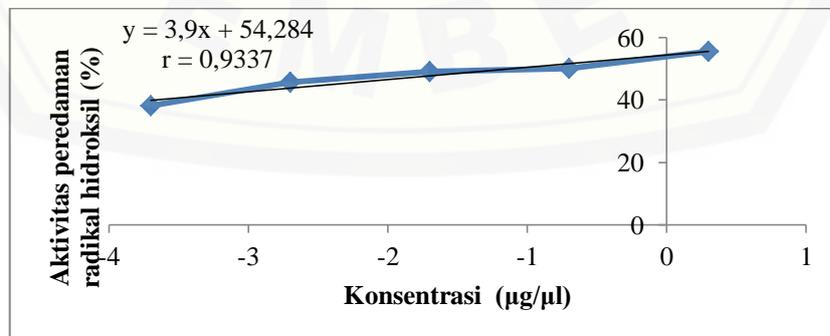
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	38,60
0,002	-2,698	43,50
0,02	-1,698	46,54
0,2	-0,698	46,87
2	0,301	51,67



y	a	b	x	antilog
50	50,45	2,951	-0,153	0,70389

E.1.1 Nilai IC₅₀ Gg-PK replikasi 2

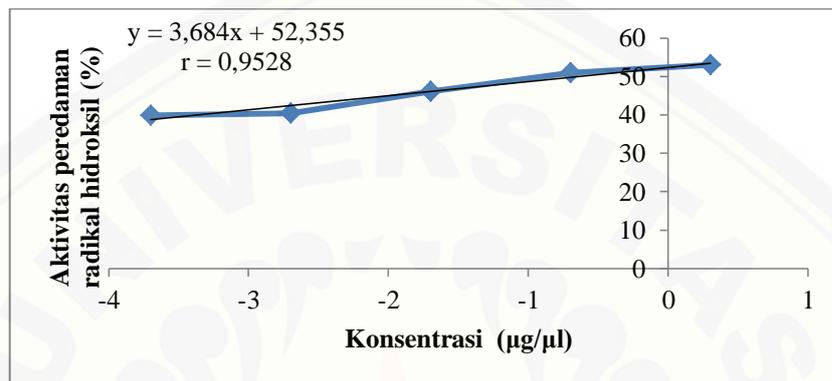
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	38,13
0,002	-2,698	45,60
0,02	-1,698	49,11
0,2	-0,698	50,04
2	0,301	55,41



y	a	b	x	antilog
50	54,284	3,9	-1,098	0,07971

E.1.2 Nilai IC₅₀ Gg-PK replikasi 3

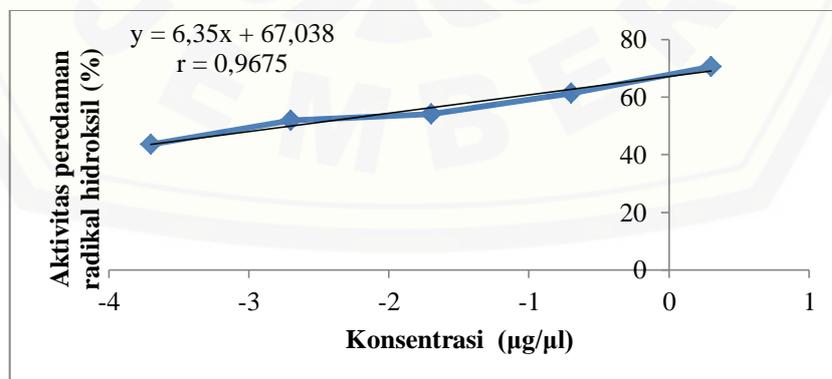
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsenterasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	39,90
0,002	-2,698	40,47
0,02	-1,698	46,07
0,2	-0,698	50,97
2	0,301	53,07



y	a	b	x	antilog
50	52,355	3,684	-0,639	0,22948

E.2 Nilai IC₅₀ Gg-PH (terimobilisasi) replikasi 1

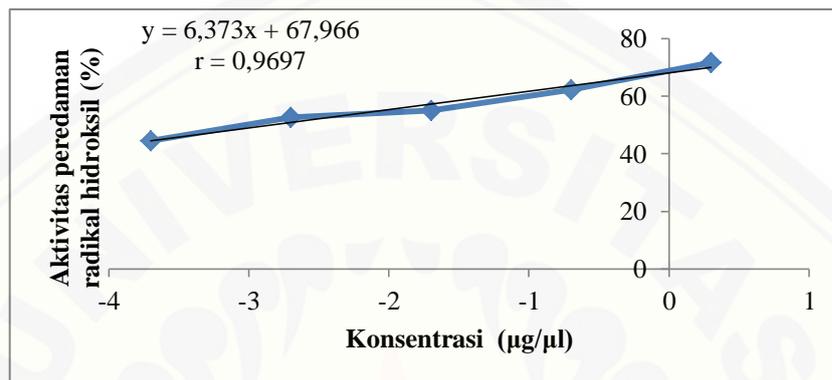
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsenterasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	43,50
0,002	-2,698	51,91
0,02	-1,698	54,01
0,2	-0,698	61,25
2	0,301	70,58



y	a	b	x	antilog
50	67,038	6,35	-2,683	0,002074

E.2.1 Nilai IC₅₀ Gg-PH (terimobilisasi) replikasi 2

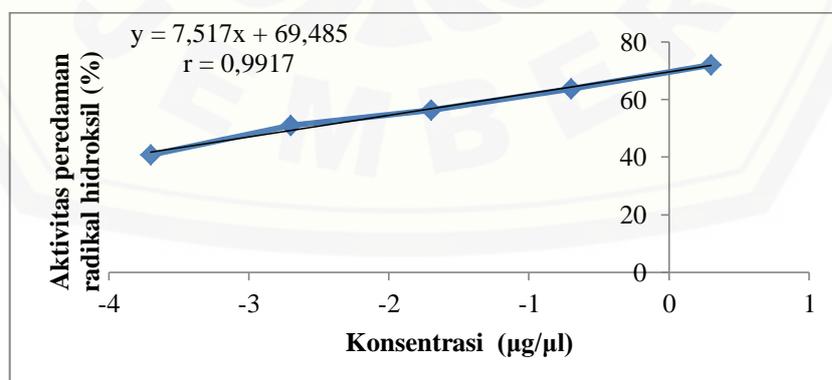
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	44,44
0,002	-2,698	52,61
0,02	-1,698	54,94
0,2	-0,698	62,18
2	0,301	71,52



y	a	b	x	antilog
50	67,996	6,373	-2,819	0,00151

E.2.2 Nilai IC₅₀ Gg-PH (terimobilisasi) replikasi 3

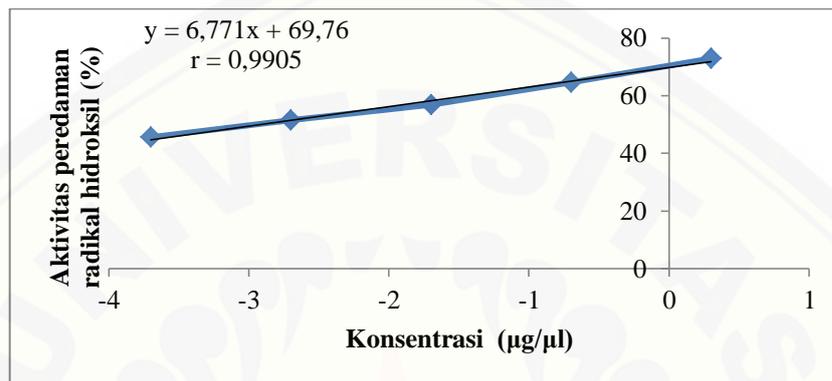
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	40,70
0,002	-2,698	50,97
0,02	-1,698	56,34
0,2	-0,698	63,58
2	0,301	71,98



y	a	b	x	antilog
50	69,485	7,517	-2,592	0,00255

E.3 Nilai IC₅₀ Gg-PH (bebas) replikasi 1

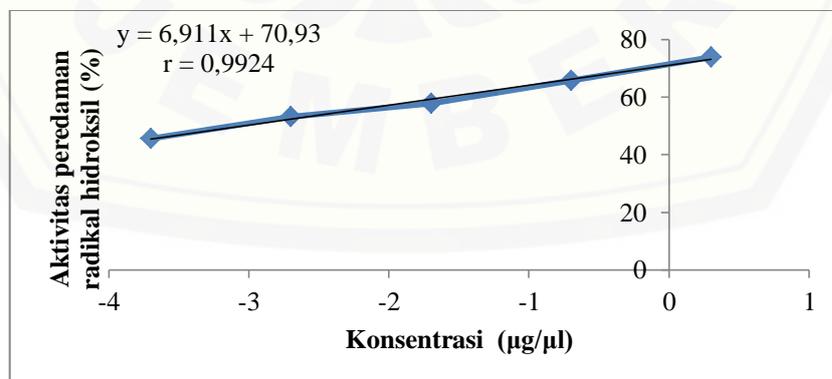
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsenterasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	45,60
0,002	-2,698	51,44
0,02	-1,698	56,81
0,2	-0,698	64,51
2	0,301	72,92



y	a	b	x	antilog
50	69,76	6,771	-2,918	0,00120

E.3.1 Nilai IC₅₀ Gg-PH (bebas) replikasi 2

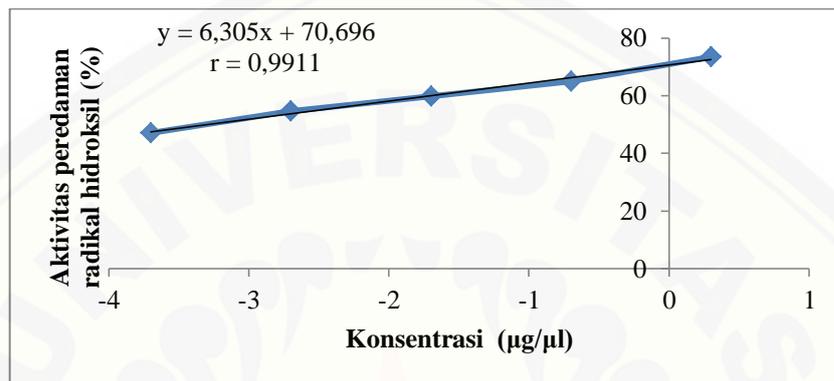
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsenterasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	45,60
0,002	-2,698	53,07
0,02	-1,698	57,74
0,2	-0,698	65,68
2	0,301	73,85



y	a	b	x	antilog
50	70,93	6,911	-3,028	0,000936

E.3.2 Nilai IC₅₀ Gg-PH (bebas) replikasi 3

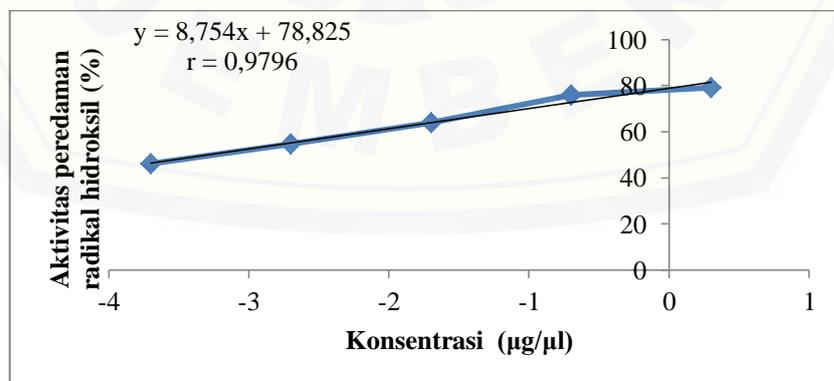
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	47,00
0,002	-2,698	54,71
0,02	-1,698	59,84
0,2	-0,698	64,98
2	0,301	73,39



y	a	b	x	antilog
50	70,696	6,305	-3,282	0,000522

E.4 Nilai IC₅₀ GSH replikasi 1

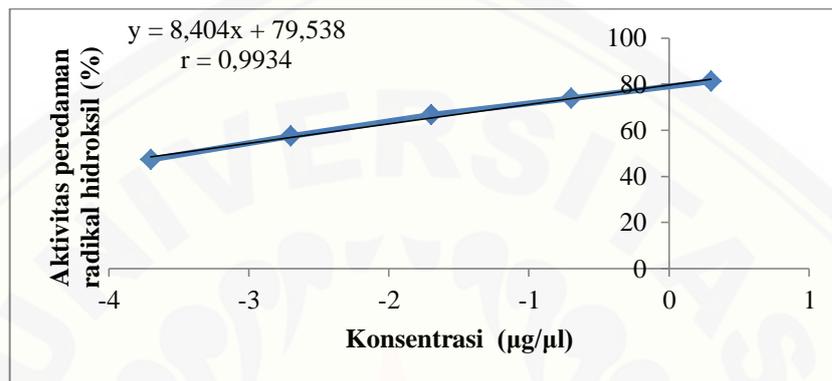
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	46,07
0,002	-2,698	54,71
0,02	-1,698	63,81
0,2	-0,698	75,95
2	0,301	79,22



y	a	b	x	antilog
50	78,825	8,754	-3,292	0,00051

E.4.1 Nilai IC₅₀ GSH replikasi 2

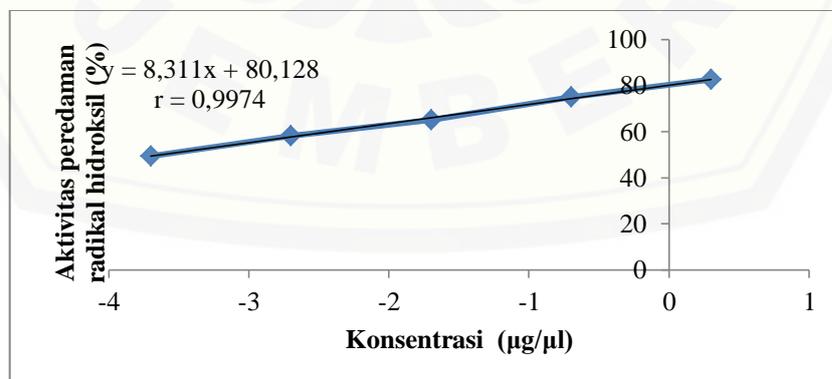
Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	47,24
0,002	-2,698	57,51
0,02	-1,698	66,61
0,2	-0,698	73,85
2	0,301	81,09



y	a	b	x	antilog
50	79,538	8,404	-3,514	0,000306

E.4.2 Nilai IC₅₀ GSH replikasi 3

Konsentrasi (µg/µl)	Log konsententrasi	Peredaman (%)
0,0002	-3,698	49,34
0,002	-2,698	58,21
0,02	-1,698	64,98
0,2	-0,698	75,02
2	0,301	82,49



y	a	b	x	antilog
50	80,128	8,311	-3,625	0,000237

E.5 Uji Normalitas

Tests of Normality

Sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
PK	.177	3	.	1.000	3	.968
PH	.222	3	.	.985	3	.668
PHB	.270	3	.	.949	3	.563
GSH	.284	3	.	.933	3	.501

a. Lilliefors Significance Correction

- Dari hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data normal ($p > 0,05$).

E.6 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

IC₅₀

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.785	3	8	.228

- Dari hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data homogen ($p > 0,05$), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA

E.7 Uji ANOVA

ANOVA

IC ₅₀	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14.128	3	4.709	66.200	.000
Within Groups	.569	8	.071		
Total	14.697	11			

E.8 Uji *Post Hoc* tipe LSD

Multiple Comparisons

IC₅₀

LSD

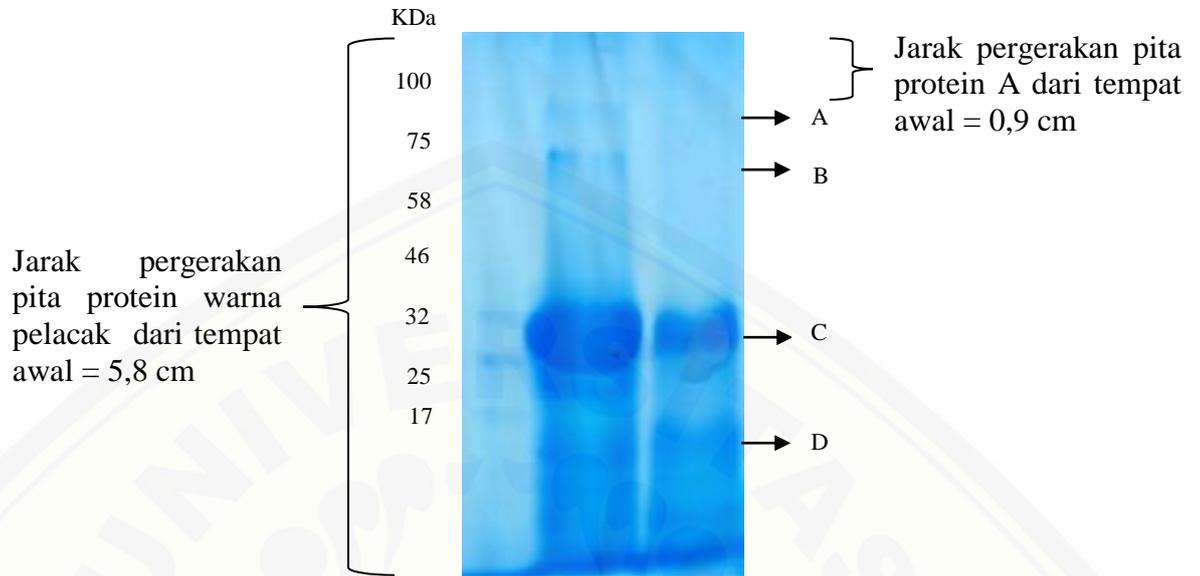
(I) Sampel	(J) Sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
PK	PH	2.06915*	.21777	.000	1.5670	2.5713
	PHB	2.44721*	.21777	.000	1.9450	2.9494
	GSH	2.79039*	.21777	.000	2.2882	3.2926
PH	PK	-2.06915*	.21777	.000	-2.5713	-1.5670
	PHB	.37807	.21777	.121	-.1241	.8803
	GSH	.72124	.21777	.011	.2191	1.2234
PHB	PK	-2.44721*	.21777	.000	-2.9494	-1.9450
	PH	-.37807	.21777	.121	-.8803	.1241
	GSH	.34318	.21777	.154	-.1590	.8454
GSH	PK	-2.79039*	.21777	.000	-3.2926	-2.2882
	PH	-.72124	.21777	.011	-1.2234	-.2191
	PHB	-.34318	.21777	.154	-.8454	.1590

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

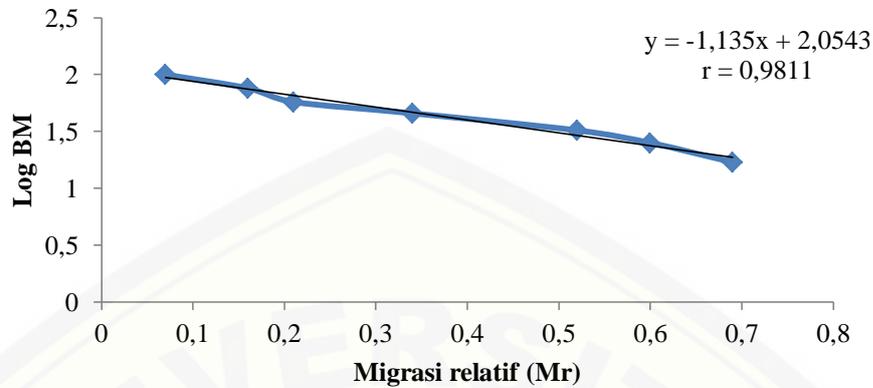
Lampiran F. Nilai IC₅₀ Gg-PK, Gg-PH (terimobilisasi), Gg-PH (bebas) dan GSH

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Absorbansi			Peredaman (%)			Rata-rata (%)
Gg-PK	0,0002	0,263	0,265	0,26	38,60	38,13	39,30	
	0,002	0,242	0,233	0,255	43,50	45,60	40,47	
	0,02	0,229	0,218	0,231	46,54	49,11	46,07	
	0,2	0,219	0,214	0,210	48,87	50,04	50,97	
	2	0,207	0,191	0,201	51,67	55,41	53,07	
IC ₅₀					0,7039	0,0797	0,2295	0,3376 \pm 0,0258
Gg-PH (terimobilisasi)	0,0002	0,242	0,238	0,224	45,50	44,44	47,70	
	0,002	0,206	0,203	0,210	51,91	52,61	50,97	
	0,02	0,197	0,193	0,187	54,01	54,94	56,34	
	0,2	0,166	0,162	0,156	61,25	62,18	63,58	
	2	0,126	0,122	0,120	70,58	71,52	71,98	
IC ₅₀					0,0021	0,0015	0,0026	0,0020 \pm 0,0005
Gg-PH (bebas)	0,0002	0,233	0,233	0,227	45,60	45,60	47,00	
	0,002	0,208	0,201	0,194	51,44	53,07	54,71	
	0,02	0,185	0,181	0,172	56,81	57,74	59,84	
	0,2	0,152	0,147	0,150	64,51	65,68	64,98	
	2	0,116	0,112	0,114	72,92	73,85	73,39	
IC ₅₀					0,0012	0,0009	0,0005	0,0008 \pm 0,0003
GSH	0,0002	0,231	0,226	0,217	46,07	47,24	49,34	
	0,002	0,194	0,182	0,179	54,71	57,51	58,21	
	0,02	0,155	0,143	0,150	63,81	66,61	64,98	
	0,2	0,103	0,112	0,107	75,95	73,85	75,02	
	2	0,089	0,081	0,075	79,22	81,09	82,49	
IC ₅₀					0,0005	0,0003	0,0002	0,0003 \pm 0,0001

Lampiran G. Pengukuran Berat Molekul Protein



Pita protein standar	Jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)	Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (cm)	Migrasi Relatif (Mr)	Berat Molekul (BM) (KDa)	Log BM
1	0,4		0,07	100	2
2	0,9		0,16	75	1,88
3	1,2		0,21	58	1,76
4	2	5,8	0,34	46	1,66
5	3		0,52	32	1,51
6	3,5		0,60	25	1,40
7	4		0,69	17	1,23

Kurva standar berat molekul**Perhitungan**

Pita protein standar	Jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)	Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (cm)	Migrasi Relatif (Mr)	Log BM	Berat Molekul (BM) (KDa)
A	0,9	5,8	0,16	1,88	76
B	1,3		0,22	1,80	63
C	3,3		0,57	1,41	26
D	4,6		0,79	1,15	14

Contoh perhitungan pita:

Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal = 0,9 cm

Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal = 5,8 cm

$$\text{Migrasi relatif} = \frac{0,9 \text{ cm}}{5,8 \text{ cm}} = 0,16$$

Persamaan kurva standar berat molekul $y = -1,134x + 2,0543$

$$\text{Log BM} : y = -1,134 (0,16) + 2,0543; y = 1,88$$

BM : antiLog y ; antiLog 1,88 yaitu 76

Sehingga berat molekul yang diperoleh sebesar 76 KDa.

Lampiran H. Perhitungan Plasmid DNA

Konsentrasi plasmid yang diharapkan = 0,5 μg

Konsentrasi plasmid yang diperoleh = 0,117 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

$$\begin{aligned}\text{Volume plasmid yang dibutuhkan} &= \frac{0,5 \mu\text{g}}{0,117 \mu\text{g}/\mu\text{l}} \\ &= 4,27 \mu\text{l}\end{aligned}$$

