



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO
(*Gnetum gnemon* L.) SEBAGAI INHIBITOR AKTIVITAS
 α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :

Robitha Kartika Sari

112010101081

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO
(*Gnetum gnemon* L.) SEBAGAI INHIBITOR AKTIVITAS
 α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**Oleh :
Robitha Kartika Sari
112010101081**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT, yang telah memberikan limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga saya mendapat kesempatan untuk hidup dan menuntut ilmu, beserta Nabi Muhammad SWA yang menjadi tauladan saya;
2. Keluarga saya Mama Nanik Ratnasari dan Papa Ali Fauzi, serta kakak saya Robeth Rahmatullah;
3. Guru-guru dan dosen yang telah mendidik dan memberikan ilmunya dengan tulus sedari taman kanak-kanak hingga di perguruan tinggi;
4. Keluarga besar Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan saudara seangkatan CARDIO FK 2011 serta almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
5. *Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST)* Universitas Jember;
6. Bangsa dan Tanah Airku Indonesia.

MOTTO

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

(terjemahan QS: Al-Baqarah: 216*)

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

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Robitha Kartika Sari

NIM : 112010101081

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah dengan judul “UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) SEBAGAI INHIBITOR AKTIVITAS α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE SECARA *IN VITRO*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan tersebut tidak benar.

Jember, 11 Mei 2015

(Robitha Kartika Sari)
NIM 112010101081

SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) SEBAGAI
INHIBITOR AKTIVITAS α -AMILASE DAN α -GLUKOSIDASE
SECARA *IN VITRO***

Oleh

Robitha Kartika Sari

NIM 112010101081

Pembimbing :

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) sebagai Inhibitor Aktivitas α -Amilase dan α -Glukosidase secara *in Vitro***” telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Senin, 11 Mei 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

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

NIP 197008101998031001

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

NIP 197702222002122001

Penguji I,

Penguji II,

dr. Ali Santoso, Sp.PD
NIP 195909041987011001

dr. Sugiyanta, M. Ked.
NIP 197902072005011001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

dr. Eny Suswati, M. Kes.
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) sebagai Inhibitor Aktivitas α -Amilase dan α -Glukosidase secara *in Vitro*; Robitha Kartika Sari; 112010101081; 2015: 74 Halaman; Fakultas Kedokteran; Universitas Jember.

Diabetes Melitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya. Diabetes Melitus terdiri dari beberapa tipe, salah satunya adalah *Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM tipe 2) yang mencapai 90-95% dari populasi penderita diabetes melitus. Peningkatan jumlah penderita diabetes melitus tipe 2 sudah menjadi perhatian serius sedangkan obat sintetis yang telah banyak digunakan, seperti akarbose dilaporkan menyebabkan berbagai efek samping seperti rasa mual, kembung, atau diare.

Akarbose bekerja menghambat enzim pemecah karbohidrat seperti α -amilase dan α -glukosidase. α -amilase di air liur dan pankreas akan menghidrolisis polisakarida menjadi oligosakarida dan dekstrin yang akan dihidrolisis lebih lanjut oleh α -glukosidase di membran *brush border* intestinal menjadi glukosa. Glukosa yang telah terbentuk akan diabsorpsi oleh epithelium intestinal dan masuk ke peredaran darah. Oleh sebab itu inhibisi salah satu atau kedua enzim tersebut akan menghambat absorpsi glukosa sehingga kadar glukosa darah akan menurun.

Dalam kurun waktu dua dekade ini para peneliti telah berupaya untuk dapat menemukan protein baru alami yang dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan protein fungsional alami. Sumber protein alami dapat diperoleh dari hewan atau tumbuhan. Di Indonesia, Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon L.*) merupakan salah satu komoditas favorit di mana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) terdiri dari 58% pati, 16.4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik. Kandungan protein yang tinggi

mencapai 9-10% itulah yang dianggap memiliki potensi dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tahapan pemurnian protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang paling efektif sebagai inhibitor aktivitas α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro*. Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental (*true experimental*). Sampel uji yang dipergunakan merupakan tiga tahapan pemurnian protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH. Konsentrasi larutan uji adalah 50 $\mu\text{g/mL}$ dalam pengujian penghambatan enzim α -amilase sedangkan konsentrasi larutan pada uji penghambatan α -glukosidase adalah 25 $\mu\text{g/mL}$. Data yang diperoleh berupa persen (%) penghambatan. Analisis data menggunakan uji normalitas dan homogenitas, selanjutnya uji dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* jika data terdistribusi normal dan homogen.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan terdapat aktivitas protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dalam menghambat enzim α -amilase dan α -glukosidase. Kemampuan paling tinggi dalam menghambat enzim alfa amilase dan alfa glukosidase ditunjukkan oleh protein terhidrolisis biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah karakter protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH) memiliki aktivitas penghambatan aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase paling tinggi diantara tahapan pemurnian protein lainnya, ditunjukkan dengan presentase penghambatan α -amilase sebesar $72,09 \pm 0,58\%$ dan presentase penghambatan α -glukosidase sebesar $51,7 \pm 4,4\%$.

PRAKATA

Puji Syukur atas ridho dan rahmat yang diberikan oleh Allah S.W.T sehingga penelitian dengan judul “Uji Efektivitas Protein Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) sebagai Inhibitor Aktivitas α -Amilase dan α -Glukosidase Secara *in Vitro*” dapat terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak terdapat kekurangan dan kelemahan, baik dari teknik penulisan maupun materi.

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

1. dr. Enny Suswati, M. Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran, Universitas Jember;
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) yang dengan penuh kesabaran memberi banyak pengarahan dalam penyelesaian skripsi;
3. Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dengan ketekunan dan kesabarannya dalam meluangkan segenap waktunya untuk membimbing saya;
4. dr. Ali Santoso, Sp.PD dan dr. Sugiyanta, M. Ked selaku penguji yang memberi kritik, saran, dan masukan dalam penyelesaian Karya Tulis Ilmiah ini;
5. dr. Sugiyanta, M.Ked, selaku koordinator Tim KTI Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
6. Segenap Dosen Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah membagi ilmu pengetahuan selama ini;
7. Ayahanda Ali Fauzi dan Ibunda Nanik Ratnasari, orang tua tersayang yang telah memberi kasih sayang, doa, bimbingan, dukungan, dan pengorbanan;
8. Kakak saya Robeth Rahmatullah yang selama ini telah memberikan dukungan, kasih sayang, motivasi dan semangat yang diberikan tiada henti;

9. Keluarga Besar Fakultas Kedokteran Angkatan 2011 “CARDIO FK 2011”, atas semangat, dukungan dan motivasi yang kalian berikan. Kebersamaan dan kenangan ini tak akan pernah terlupakan;
10. Sahabat seperjuangan FK Dea Resita Azharini, Dyah Fitri A., Sharfina, Siti Fatimah, Rina Nur Anisa, Luky Mustika Dewi, Olyvia Y., Izat Fuadi, Mumtaz Zuhhad, Ardiansyah P., atas bantuan dan kesabaran mendengarkan setiap keluh kesah dan memberikanku semangat selama belajar di Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
11. Segenap anggota Divisi Neuraseutikal dan Farmaseutikal *Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST) “Melinjo Group”* yang telah mendukung dan senantiasa membantu dalam proses penelitian. Serta teman-teman seperjuangan dalam menyelesaikan skripsi Tri Aji Pudjo, Andhy Isra Biby, Ria Nathania Mahasiwi, A. Nuriyah, Dede Abdillah, Rony Setiawan, Adi Rahmat, Rio Azimah, dan Bayu Darmawan, Lilik Duwi Wahyudi, Susilowati, Jainur Rochman;
12. Sahabat terbaik saya, Arief Karimauv dan Dyah Putri H., yang selalu ada dan memberikan banyak bantuan;
13. Semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan baik secara moril maupun materi hingga terselesaikannya penulisan Karya Tulis Ilmiah ini;

Jember, 11 Mei 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Diabetes Melitus	5
2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus	5
2.1.3 Diagnosis Diabetes Melitus	7
2.1.4 Komplikasi	8
2.1.5 Terapi	10
2.2 Metabolisme Karbohidrat	11
2.3 Enzim α-Amilase dan α-Glukosidase	15

2.3.1 Enzim α -Amilase	15
2.3.2 Enzim α -Glukosidase.....	18
2.4 Inhibitor Enzim	19
2.4.1 Inhibitor Kompetitif	20
2.4.2 Inhibitor Non Kompetitif	20
2.5 Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	21
2.5.1 Taksonomi.....	22
2.5.2 Habitat	23
2.5.3 Manfaat Tanaman Melinjo.....	23
2.5.4 Kandungan Gizi Melinjo.....	24
2.6 Protein	24
2.6.1 Protein Isolat	25
2.6.2 Protein Terhidrolisis.....	26
2.7 Analisis kuantitatif Protein	29
2.8 SDS-PAGE.....	29
2.9 Kerangka Konseptual	31
2.10 Hipotesis Penelitian.....	32
BAB 3. METODE PENELITIAN	32
3.1 Jenis Penelitian	32
3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian	32
3.3 Sampel Penelitian	32
3.4 Rancangan Penelitian	33
3.5 Alat Dan Bahan	34
3.6 Variabel Penelitian.....	34
3.7 Definisi Operasional.....	35
3.8 Prosedur Kerja	36
3.9 Analisis Statistik.....	42
3.10 Alur Penelitian.....	43

3.11 Persetujuan Etik	44
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	45
4.1 Ekstraksi Protein Kasar Biji Melinjo (Gg-PK)	45
4.2 Isolasi Protein Biji Melinjo (Gg-PI)	45
4.3 Hidrolisis Protein Biji Melinjo (Gg-PH) dan Penentuan Derajat Hidrolisis (DH)	46
4.4 Pola Pita Protein Biji Melinjo pada Elektroforesis SDS-PAGE	47
4.5 Uji Aktivitas Penghambatan α -Amilase.....	50
4.6 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase.....	52
BAB 5. PENUTUP	59
5.1 Kesimpulan	59
5.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR TABEL

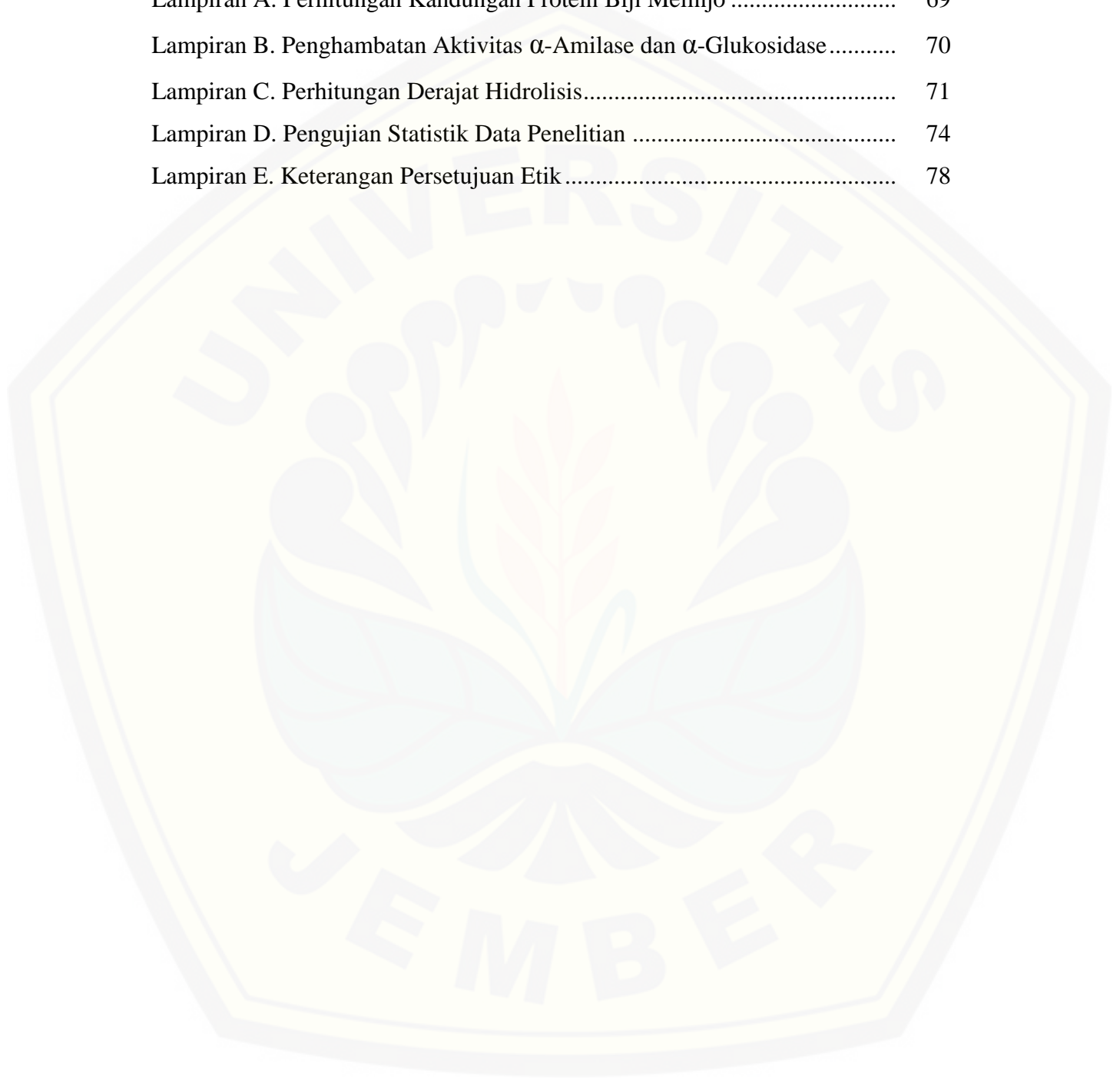
Tabel 2.1 Kriteria Penegakan Diagnosis Diabetes Melitus.....	7
Tabel 2.2 Kondisi Berdasarkan Kadar Glukosa Darah	10
Tabel 2.3 Klasifikasi Karbohidrat	13
Tabel 2.4 Kandungan Gizi Melinjo.....	17
Tabel 3.1 Jumlah larutan pada analisis aktivitas inhibisi α -amilase	41
Tabel 3.2 Jumlah larutan pada analisis aktivitas inhibisi α -glukosidase	42
Tabel 4.1 Hasil Produksi Bertahap Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon L.</i>)	47
Tabel 4.2 Perbandingan pita protein hasil SDS-PAGE dari sampel protein biji melinjo.....	50

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Komplikasi Diabetes Melitus	5
Gambar 2.2 Bagan proses pencernaan karbohidrat.....	12
Gambar 2.3 Struktur alfa amilase.....	18
Gambar 2.4 Dua jenis polimer glukosa yang ada dalam pati.....	20
Gambar 2.5 Buah Melinjo.....	21
Gambar 2.6 Pembentukan ikatan peptida diantara dua asam amino.....	25
Gambar 2.7 Reaksi Reagen TNBS dengan asam amino	29
Gambar 2.8 Pemasangan gel elektroforesis poliakrilamida.....	30
Gambar 2.9 Skema kerangka konsep	31
Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian	33
Gambar 4.1 Elektroforesis SDS-PAGE	49
Gambar 4.2 Aktivitas Penghambatan α -Amilase pada Berbagai Sampel Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	55
Gambar 4.3 Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase pada Berbagai Sampel Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Perhitungan Kandungan Protein Biji Melinjo	69
Lampiran B. Penghambatan Aktivitas α -Amilase dan α -Glukosidase.....	70
Lampiran C. Perhitungan Derajat Hidrolisis.....	71
Lampiran D. Pengujian Statistik Data Penelitian	74
Lampiran E. Keterangan Persetujuan Etik	78



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) merupakan penyakit endokrin yang paling umum di dunia. Pada tahun 2005 sekitar 173 juta orang menderita Diabetes Melitus. Jumlah penderita diabetes melitus akan meningkat lebih dari dua kali lipat menjadi 366 juta pada tahun 2030 (Funke and Melzig, 2006). Pada tahun 2000, Indonesia menempati posisi keempat jumlah penderita diabetes melitus terbanyak, setelah India, Cina, dan Amerika Serikat, yaitu sekitar 8,4 juta jiwa. Jumlah tersebut diperkirakan akan meningkat menjadi 21,3 juta jiwa pada tahun 2030 (Wild *et al.*, 2004).

Diabetes Melitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya (Dipiro *et al.*, 2005). Diabetes Melitus terdiri dari beberapa tipe, salah satunya adalah *Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM, diabetes melitus tipe 2). Diabetes Melitus tipe ini lebih umum terjadi yaitu mencapai 90-95% dari populasi penderita diabetes melitus (Dirjen Binfar Depkes RI, 2005). Peningkatan jumlah penderita diabetes melitus tipe 2 menjadi perhatian serius. Berbagai penelitian dilakukan untuk menemukan agen terapeutik baru yang mampu mengobati diabetes melitus tipe ini. Meskipun pengobatan diabetes melitus tipe 2 terus berkembang pada beberapa dekade terakhir, namun toleransi obat masih menjadi masalah besar yang membutuhkan solusi efektif. Hal tersebut menyebabkan obat yang bekerja dengan efektif tetapi memiliki efek samping minimal menjadi tujuan ideal peneliti (Lam *et al.*, 2008).

Perkembangan DM tipe 2 dapat dianalisa melalui hiperglikemia postprandial. Sehingga salah satu pendekatan terapeutik yang bisa dilakukan untuk mengontrol DM dan komplikasinya adalah mengontrol kadar glukosa postprandial (You *et al.*, 2011). Hiperglikemia postprandial dapat dikontrol

melalui penghambatan enzim pemecah karbohidrat seperti α -amilase dan α -glukosidase. α -amilase di air liur dan pankreas akan menghidrolisis polisakarida menjadi oligosakarida dan dekstrin yang akan dihidrolisis lebih lanjut oleh α -glukosidase di membran *brush border* intestinal menjadi glukosa. Glukosa yang telah terbentuk akan diabsorpsi oleh epithelium intestinal dan masuk ke peredaran darah (Feng *et al.*, 2011). Oleh sebab itu inhibisi salah satu atau kedua enzim tersebut akan menghambat absorpsi glukosa sehingga kadar glukosa darah akan menurun.

Akarbose, miglitol dan voglibose merupakan obat antidiabetik sintetis yang bekerja menghambat α -amilase dan α -glukosidase yang sudah digunakan secara klinik dengan kombinasi bersama diet atau obat antidiabetik lain untuk mengontrol tingkat glukosa darah pasien. Akan tetapi obat sintetis tersebut mempunyai berbagai efek samping seperti rasa mual, kembung, atau diare (Feng *et al.*, 2011). Obat sintetis umumnya hanya bekerja melalui satu mekanisme sehingga banyak penelitian diarahkan untuk terapi menggunakan bahan alami agar terhindar dari efek samping tersebut. Selain itu bahan alami mengandung beberapa senyawa aktif yang kemungkinan bekerja melalui mekanisme yang berbeda dan memiliki efek sinergis, sehingga diharapkan aktivitas farmakologisnya menjadi lebih baik (Istvan, 2003).

Belakangan ini komponen bahan aktif dari beberapa tanaman obat, bahan pangan, dan produk pertanian lainnya telah dilaporkan mempunyai aktivitas biologis yang berguna untuk pengobatan penyakit diabetes. Efek hipoglikemik komponen bioaktif pada tanaman dapat mengembalikan fungsi sel pankreas sehingga dapat meningkatkan sekresi insulin, menghambat absorpsi glukosa di usus dan menghambat kerja enzim α -amilase dan α -glukosidase (Kim *et al.*, 2006). Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat alami digunakan masyarakat Indonesia terutama di daerah pedesaan yang masih kaya dengan keanekaragaman tumbuhannya. Menurut Muhliah (2001) obat tradisional yang berasal dari tumbuhan memiliki efek samping yang jauh lebih rendah tingkat bahayanya dibandingkan obat-obatan kimia. Akan tetapi, khasiat tanaman obat di Indonesia masih berdasarkan data empiris, sehingga perlu dibuktikan secara ilmiah. Bukti-

bukti ilmiah akan lebih meningkatkan dan memantapkan masyarakat dalam menggunakan obat tradisional (Muhlisah, 2001).

Dalam kurun waktu dua dekade ini para peneliti telah berupaya untuk dapat menemukan protein baru alami yang dapat digunakan sebagai dasar dalam pembuatan protein fungsional alami (Hancock, 2000). Keanekaragaman protein fungsional menjadikan suatu pertimbangan dalam menemukan bahan alami yang bisa dimanfaatkan di beberapa bidang (Marshall, 2003). Sumber protein alami dapat diperoleh dari hewan atau tumbuhan. Indonesia kaya akan biodiversitas tumbuhan lokal yang berpotensi sebagai sumber protein fungsional. Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.), banyak dibudidayakan di Indonesia, Malaysia dan beberapa negara Asia Tenggara. Di Indonesia, tanaman ini merupakan salah satu komoditas favorit di mana bijinya dapat dimakan setelah dimasak dan dibuang kulitnya. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terdiri dari 58% pati, 16.4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo and Aldino, 2007).

Sampai saat ini belum ada penelitian ilmiah yang secara jelas menyebutkan bahwa protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki kemampuan menghambat aktivitas α -amilase dan α -glukosidase. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap efektifitas protein biji melinjo sebagai inhibitor aktivitas α -amilase dan α -glukosidase agar informasi tersebut dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian yang telah disebutkan diatas, maka permasalahan yang akan dibahas dalam penulisan skripsi ini adalah bagaimana efektivitas penghambatan protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas beberapa tahap pemurnian protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai inhibitor aktivitas α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui efektivitas protein kasar (Gg-PK) ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro*.
- b. Untuk mengetahui efektivitas protein isolat (Gg-PI) ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro*.
- c. Untuk mengetahui efektivitas protein terhidrolisis (Gg-PH) ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain:

1. Menambah wawasan dan pengetahuan di bidang penggunaan nutrasetikal dan farmasetikal biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.).
2. Memberikan informasi mengenai penghambatan aktivitas α -amilase dan α -glukosidase oleh protein ekstrak biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.).
3. Memberikan informasi yang dapat menjadi dasar untuk bagi penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus

2.1.1 Definisi Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, gangguan kerja insulin atau keduanya yang menimbulkan berbagai komplikasi kronik pada mata, ginjal, saraf dan pembuluh darah (Perkeni, 2011).

DM ditandai dengan kadar glukosa darah yang melebihi normal (hiperglikemia) dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh kekurangan hormon insulin secara relatif maupun absolut. Apabila dibiarkan tidak terkendali dapat terjadinya komplikasi metabolik akut maupun komplikasi vaskuler jangka panjang (Soegondo, 2004).

2.1.2 Klasifikasi Diabetes Melitus

2.1.2.1 Diabetes melitus tipe 1 (*Insulin-Dependent Diabetes Melitus*)

Gangguan produksi insulin pada DM tipe 1 umumnya terjadi karena kerusakan sel-sel β pulau Langerhans yang disebabkan oleh reaksi autoimun. Penanda (*marker*) kerusakan kekebalan sel β ditemukan pada diagnosis 90% dari penderita DM dan mencakup sel islet antibodi, antibodi terhadap dekarboksilase asam glutamat, dan antibodi terhadap insulin. DM tipe ini dapat terjadi pada semua usia, anak-anak sampai orang tua. Penderita yang berusia lebih muda biasanya memiliki tingkat kerusakan sel β yang cepat dan menimbulkan ketoasidosis, sedangkan orang dewasa sering mempertahankan sekresi insulin yang cukup untuk mencegah ketoasidosis selama bertahun-tahun (DiPiro *et al.*, 2005). Diabetes tipe ini merupakan diabetes yang jarang atau sedikit populasinya, diperkirakan kurang dari 5-10% dari keseluruhan populasi penderita diabetes (Dirjen Binar Depkes, 2005).

2.1.2.2 Diabetes Melitus tipe 2 (*Non-Insulin-Dependent Diabetes Melitus*)

Diabetes tipe ini terjadi karena resistensi jaringan yang signifikan terhadap insulin yang dibarengi oleh respon sekresi insulin yang tidak cukup untuk mengatasi resistensi tersebut (Linn *et al.*, 2009). Berbeda dengan DM tipe 1, pada penderita DM tipe 2, terutama yang berada pada tahap awal, umumnya dapat dideteksi jumlah insulin yang cukup dalam darahnya, disamping kadar glukosa yang juga tinggi.

Selain resistensi insulin, pada penderita DM tipe 2 dapat juga timbul gangguan sekresi insulin dan produksi glukosa hepatic yang berlebihan. Namun demikian, tidak terjadi pengrusakan sel-sel β Langerhans secara autoimun sebagaimana yang terjadi pada DM tipe 1. Dengan demikian defisiensi fungsi insulin pada penderita DM tipe 2 hanya bersifat relatif, tidak absolute. Oleh karena itu, dalam penanganannya umumnya tidak memerlukan terapi pemberian insulin (Dirjen Binfar Depkes, 2005).

Karakteristik dari diabetes tipe ini adalah resistensi insulin serta sekresi insulin yang rendah dan semakin lama cenderung menurun. Individu dengan diabetes tipe 2 cenderung menunjukkan menunjukkan kondisi obesitas, yang merupakan akibat dari diabetes tipe 2 itu sendiri. Selain itu, hipertensi, dislipidemia (kadar trigliserida tinggi dan kadar HDL-kolesterol rendah) serta kadar inhibitor pengaktivasi plasminogen tipe 1 (PAI-1) yang meningkat juga sering terlihat pada individu tersebut (Linn *et al.*, 2009). Pengobatan penyakit ini adalah dengan pemberian obat antidiabetes (Suherman, 2007).

Diabetes tipe 2 merupakan tipe diabetes yang lebih umum, lebih banyak penderitanya dibandingkan dengan DM tipe 1. Penderita DM Tipe 2 mencapai 90-95% dari keseluruhan populasi penderita diabetes, umumnya berusia diatas 45 tahun, tapi akhir-akhir ini penderita DM tipe 2 dikalangan remaja dan anak-anak populasinya meningkat (Dirjen Binfar Depkes, 2005).

2.1.2.3 Diabetes melitus gestasional (*Gestational Diabetes Mellitus*)

Diabetes Melitus Gestasional (DGM) adalah keadaan diabetes atau intoleransi glukosa yang timbul selama masa kehamilan, dan biasanya berlangsung hanya sementara atau temporer. Sekitar 7% wanita hamil diketahui

menderita GDM, dan umumnya terdeteksi pada atau setelah trimester kedua (DiPiro *et al.*, 2005).

Diabetes gestasional terjadi pada wanita hamil yang sebelumnya tidak mengidap diabetes. Sekitar 50% wanita pengidap kelainan ini akan kembali ke status non-diabetes setelah kehamilan terakhir, namun resiko mengalami diabetes tipe 2 pada waktu mendatang lebih besar daripada wanita normal (Corwin, 2008).

2.1.2.4 Diabetes Tipe Lain

Selain dari 3 tipe diabetes melitus tersebut, terdapat tipe diabetes lainnya yaitu diabetes yang disebabkan oleh infeksi, efek samping obat, endokrinopati, kerusakan pancreas dan kelainan genetic (DiPiro *et al.*, 2005).

2.1.3 Diagnosis Diabetes Melitus

Umumnya diagnosis terhadap penyakit DM baru akan dilakukan jika pasien mengalami keluhan khas seperti poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan yang tidak jelas penyebabnya. Keluhan lain yang mungkin disampaikan penderita antara lain badan terasa lemah, sering kesemutan, gatal-gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria, dan pruritus vulvae pada wanita (Departemen Kesehatan RI, 2005)

Dalam kebanyakan kasus, DM tipe 1 dapat dengan mudah dicurigai. Riwayat poliuria, polidipsia, polifagia, dan penurunan berat badan terlihat dengan jelas. Sedangkan untuk DM tipe 2, kecurigaan dan pengujian mungkin tertunda karena manifestasi klinis yang tidak spesifik. Selanjutnya kecurigaan tersebut dikonfirmasi dengan pengecekan gula darah (Corwin, 2008).

Tabel 2.1. Kriteria penegakan diagnosis Diabetes Melitus

Klasifikasi diagnosis keadaan penderita	Glukosa plasma puasa	Glukosa plasma 2 jam setelah makan
Normal	<100 mg/dL	<140 mg/dL
Pra-Diabetes	100-125 mg/dL	---
IFG* atau IGT**	---	140-199 mg/dL
Diabetes	≥ 126 mg/dL	≥ 200 mg/dL

Keterangan : *) = *Impaired Fasting Glucose* (terganggunya glukosa puasa)

**) = *Impaired Glucose Tolerance* (terganggunya toleransi glukosa)

[Sumber: Departemen Kesehatan RI, 2005, telah diolah kembali]

Apabila pasien merasakan keluhan khas diabetes, hasil pemeriksaan kadar glukosa darah sewaktu ≥ 200 mg/dL atau kadar glukosa darah puasa ≥ 126 mg/dL sudah cukup untuk menegakkan diagnosis DM. Sedangkan jika tidak ada keluhan khas, hasil pemeriksaan kadar glukosa darah satu kali saja tidak cukup untuk menegakkan diagnosis DM. Untuk itu, diperlukan konfirmasi dengan melakukan pemeriksaan kadar glukosa darah di hari lalu (Departemen Kesehatan RI, 2005).

Untuk mendiagnosis diabetes gestasional, dilakukan skrining glukosa dalam urin ibu hamil sepanjang kehamilannya. Selain itu juga dilakukan pengukuran kadar glukosa darah puasa atau uji toleransi glukosa pada minggu ke-28 kehamilan (Corwin, 2008).

2.1.4 Komplikasi Diabetes Melitus

Berbagai komplikasi dapat diakibatkan oleh rendahnya kontrol diabetes. Komplikasi tersebut antara lain berupa penyakit vaskular sistemik (percepatan aterosklerosis), penyakit jantung, penyakit mikrovaskular pada mata, kerusakan ginjal serta kerusakan saraf tepi (neuropati diabetik) (Halliwell, 1999). Ketika diabetes terdeteksi, sindrom ini sudah berkembang dan telah terdapat satu atau dua komplikasi.

Luasnya komplikasi pada diabetes tampaknya berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab

utama kerusakan jaringan (Rahbani *et al.*, 1999). Fenomena ini dapat disebabkan oleh kemampuan hiperglikemia secara *in vivo* dalam modifikasi oksidatif berbagai substrat. Selain itu, hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas (Droge, 2002). Hiperglikemia menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif (Wolff, 1993). Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, DNA, dan protein pada berbagai jaringan. Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas. Hal itu merupakan awal kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stres oksidatif (Nuttal *et al.*, 1999).

Untuk meredam kerusakan oksidatif tersebut diperlukan antioksidan. Peningkatan suplai antioksidan yang cukup akan membantu pencegahan komplikasi klinis diabetes melitus, meskipun data penelitian belum konsisten. Komplikasi DM dapat digambarkan dalam gambar 2.1

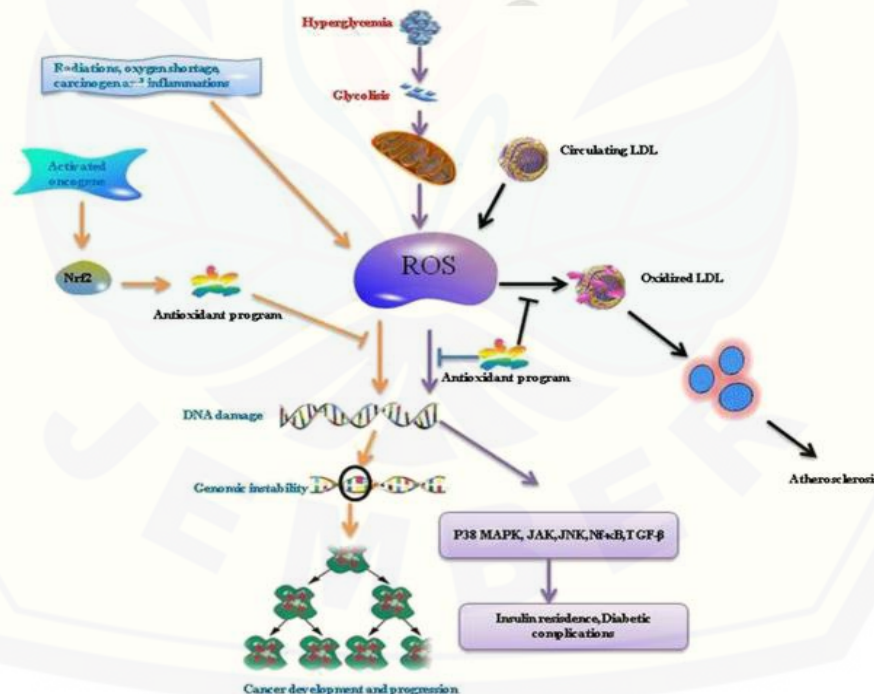


Fig. 1. Antioxidants/oxidative stress and health diseases.

Gambar 2.1 Komplikasi Diabetes Melitus (Nuttal *et al.*, 1999)

2.1.5 Terapi Diabetes Melitus

2.1.5.1 Target Terapi

Target terapi diabetes melitus adalah secara konsisten menormalkan kadar glukosa darah dengan variasi minimum. Penelitian-penelitian terakhir mengisyaratkan bahwa upaya mempertahankan kadar glukosa darah senormal dan sesering mungkin dapat mengurangi angka kesakitan dan kematian. Selain itu, terapi diabetes melitus juga bertujuan untuk mengurangi komplikasi jangka panjang mikrovaskular dan makrovaskular, mencegah komplikasi akut akibat kadar glukosa darah tinggi, meminimalkan kejadian hipoglikemik dan menjaga keseluruhan kualitas hidup pasien (Chisholm-Burns *et al.*,2008).

Tabel 2.2 Kondisi berdasarkan kadar glukosa darah

Parameter	mg/dL	mmol/L
Glukosa puasa		
Normal	<100	<5,6
<i>Impaired Fasting Glucose (IFG)</i>	100-125	5,6-6,9
Diabetes Melitus	≥126	≥7,0
Glukosa setelah makan		
Normal	<140	<7,8
<i>Impaired Glucose Tolerance (IGT)</i>	140-199	7,8-11,0
Diabetes Melitus	≥200	≥11,1

[Sumber : Chisholm-Burns, *et al.*,2008]

Asupan makanan (karbohidrat) harus dimonitor untuk mencapai kadar glukosa darah yang mendekati normal. Asupan makanan yang terlalu banyak dapat menyebabkan hiperglikemia pada penderita diabetes melitus.

2.1.5.2 Terapi farmakologi

Terapi insulin merupakan suatu keharusan bagi penderita DM Tipe 1. Pada DM Tipe 1, sel-sel β Langerhans kelenjar pankreas penderita rusak, sehingga tidak lagi dapat memproduksi insulin. Sebagai penggantinya, maka penderita DM Tipe 1 harus mendapat insulin eksogen untuk membantu agar metabolisme karbohidrat di dalam tubuhnya dapat berjalan normal. Walaupun sebagian besar penderita DM tipe 2 tidak memerlukan insulin, namun hampir 30% ternyata memerlukan terapi insulin disamping terapi hipoglikemik oral (DiPiro *et al.*, 2005).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, obat-obat hipoglikemik oral dapat dibagi menjadi tiga golongan (Dirjen Binfar Depkes, 2005), yaitu:

- a. Obat-obat yang meningkatkan sekresi insulin, meliputi obat hipoglikemik oral golongan sulfonilurea dan glinida (meglitinida dan turunan fenilalanin).
- b. Sensitizer insulin (obat-obat yang dapat meningkatkan sensitifitas sel terhadap insulin), meliputi obat-obat hipoglikemik golongan biguanida dan tiazolidindion, yang dapat membantu tubuh untuk memanfaatkan insulin secara lebih efektif.
- c. Penghambatan katabolisme karbohidrat, antara lain penghambat α -amilase dan α -glukosidase yang bekerja menghambat absorpsi glukosa dan umum digunakan untuk mengendalikan hiperglikemia *post-prandial* (*post-meal-hyperglycemia*)

2.2 Metabolisme Karbohidrat

Karbohidrat merupakan polihidroksi aldehida ataupun keton. Nama karbohidrat mempunyai rumus empiris yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah karbon 'hidrat' serta mempunyai nisbah perbandingan C terhadap H terhadap O sebanyak 1: 2: 1 (Muchtadi *et al.*, 1993). Karbohidrat disintesis oleh tanaman dari air dan karbon dioksida dengan bantuan sinar matahari. Rumus umum dari karbohidrat adalah $(\text{CH}_2\text{O})_n$. Glukosa merupakan contoh karbohidrat yang paling sederhana, dengan rumus molekul $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Glukosa sangat mudah larut dan siap ditransportasikan ke seluruh jaringan tanaman atau hewan yang

mana nantinya akan dioksidasi kembali menjadi air dan karbondioksida. Proses oksidasi tersebut akan menghasilkan energi bagi tanaman dan hewan melalui proses metabolik seluler (Mann and Truswell, 2009).

Karbohidrat adalah sumber energi yang paling penting bagi hampir seluruh penduduk di dunia. Bahan pangan utama yang mengandung karbohidrat didapat dari jenis sereal, seperti nasi, gandum, jagung, *barley*, *rye*, *oat*, *millet*, dan sorgum. Pangan berbasis karbohidrat memberikan sekitar 40-80% dari total kalori yang dibutuhkan, tergantung dari budaya dan status ekonomi (Mann and Truswell, 2009). Pangan berbasis karbohidrat juga memberikan kontribusi bagi sejumlah protein, vitamin, mineral, komponen pangan lainnya seperti fitokimia dan antioksidan.

Mann dan Truswell (2009) mengklasifikasikan karbohidrat menjadi tiga kelas berdasarkan derajat polimerisasinya, yaitu *sugars* atau gula-gula sederhana, oligosakarida, dan polisakarida. Klasifikasi karbohidrat dapat dilihat pada Tabel 2.4.

Senyawa karbohidrat kompleks (bukan monosakarida) harus dipecah terlebih dahulu menjadi senyawa yang lebih pendek dan sederhana agar dapat dimanfaatkan oleh tubuh. Muchtadi *et al.* (1993) mengemukakan bahwa proses pemecahan karbohidrat ini dibantu oleh adanya peranan enzim, seperti enzim pemecah pati (amilase atau ptialin), enzim pemecah disakarida (disakaridase), enzim sukrase intestinal yang menguraikan sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa, enzim maltase intestinal yang menguraikan maltosa menjadi glukosa dan glukosa dan enzim laktase intestinal yang menguraikan laktosa menjadi galaktosa dan glukosa. Muchtadi *et al.* (1993) juga meringkas suatu proses pencernaan karbohidrat ke dalam bagan sederhana yang dapat dilihat pada Gambar 2.3.

Karbohidrat mulai dicerna pada mulut secara mekanik dengan pengunyahan dan kimiawi oleh enzim amilase saliva yang disekresikan. Enzim amilase saliva hanya memecah pati sebagai karbohidrat kompleks bukan memecah gula-gula sederhana. Namun, aktivitas pencernaan oleh enzim tersebut akan terhenti apabila makanan sudah masuk ke lambung melalui kerongkongan karena adanya asam klorida pada lambung yang memiliki pH 2. Oleh karena itu,

hasil pencernaan yang terjadi di mulut relatif tidak begitu signifikan apabila dibandingkan dengan hasil yang diperoleh melalui proses pencernaan oleh enzim-enzim pankreas di usus halus. Pada lambung karbohidrat dihidrolisis lebih lanjut dengan hadirnya HCl dari mukosa (Astawan, 2009). Setelah itu, hasil hidrolisis dari lambung masuk mukosa usus halus, yaitu berupa campuran disakarida, α -limit dekstrin, dan sebagian kecil monosakarida. Permukaan usus halus diselimuti oleh mikrofili-mikrofili sehingga memperluas permukaan area penyerapan lebih dari 200 m². Membran mikrofili biasa disebut dengan istilah *brush border*. Menurut Cummings dan Mann (2009), ada tiga enzim utama yang menyelesaikan proses pencernaan karbohidrat menjadi monosakarida, yaitu 1) glukoamilase (α -glukosidase), 2) sukrose isomaltase (mengurangi produk hasil pencernaan pati dengan mengubahnya menjadi monomer glukosa, serta memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa), dan 3) laktase atau β -galaktosidase (menghidrolisis laktosa menjadi glukosa dan galaktosa).

Glukosa, galaktosa, dan fruktosa dibawa dari usus halus ke liver melalui darah. Liver mengonversi seluruh fruktosa dan galaktosa menjadi glukosa. Glukosa digunakan sebagai sumber energi dan disimpan sebagai glikogen apabila jumlahnya sudah berlebih.

Gula alkohol seperti sorbitol dan manitol tidak mempunyai mekanisme yang spesifik sehingga diserap melalui difusi sederhana. Apabila jumlah gula alkohol yang dikonsumsi berlebihan, melebihi kapasitas usus halus, maka sebagian tidak diserap di usus halus dan dibiarkan melewati usus besar. Gula alkohol memiliki bobot molekul yang relatif kecil sehingga dapat menahan sejumlah air pada usus besar yang dapat mengakibatkan diare.

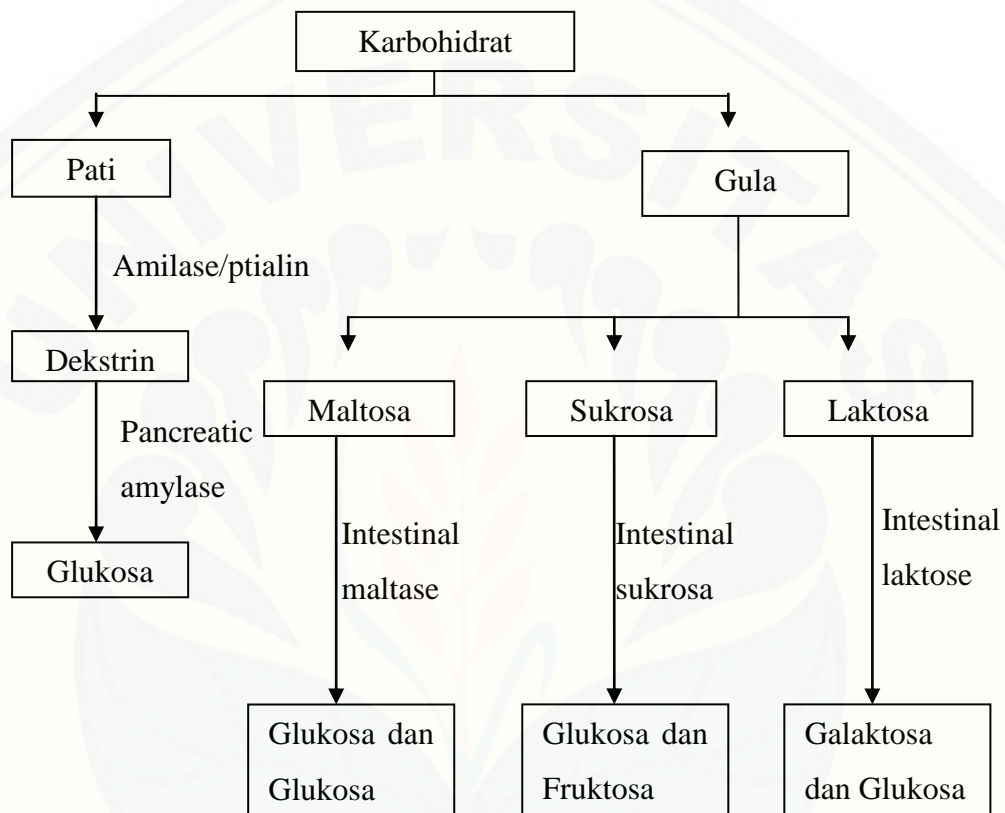
Tabel 2.3 Klasifikasi karbohidrat

Kelas (Derajat Polimerisasi)	Sub-Kelas	Komponen Utama
Sugars (1-2)	1. Monosakarida	Glukosa, Fraktosa, Galaktosa
	2. Disakarida	Sukrosa, Laktosa, Maltosa, Trehalosa.
	3. Polyols (gula alkohol)	Sorbitol, Mannitol, Laktitol, Xylitol, Eritritol.
Oligosakarida (3-9) (karbohidrat rantai pendek)	1. Malto-oligosakarida (α -glucans)	Maltodekstrin
	2. Oligosakarida bukan α -glucans	Kafinosa, Stakiosa, Fruktooligosakarida, Galaktooligosakarida, polidektrosa, inulin.
Polisakarida (≥ 10)	1. Pati (α -glucans)	Amilosa, Amilopektin, Pati termodifikasi
	2. Polisakarida bukan pati	Selulosa, emiselulosa, Pektin, Arabinoxylans, Glucomannans, Plant gums dan getah (<i>mucilages</i>), Hidrokoloid.

Sumber : Mann dan Truswell (2009)

Pati resisten, oligosakarida bukan α glukon (fruktooligosakarida dsb.), dan polisakarida bukan pati (selulosa dsb.) tidak dapat dicerna oleh tubuh dan akan melewati usus halus dan memasuki usus besar atau kolon untuk difermentasi. Hal ini diperkirakan karena ikatan kimia dan bentuk fisik jenis karbohidrat tersebut yang tidak mudah diserap baik oleh *brush border* maupun enzim-enzim pankreas,

contohnya selulosa memiliki ikatan β -1,4 (berkebalikan dengan pati yang memiliki ikatan α -1,4). Perbedaan stereokimia tersebut dapat mencegah proses hidrolisis selulosa oleh enzim amilase di pankreas. Semua karbohidrat yang memasuki kolon akan difermentasi dengan bakteri yang hidup di kolon. Bakteri di kolon jumlahnya sekitar 10^{12} sel/gram.



Gambar 2.2 Bagan proses pencernaan karbohidrat (Muchtadi *et al.*, 1993)

2.3 Enzim α -Amilase dan α -Glukosidase

2.3.1 α -Amilase

α -amilase adalah kalsium *metalloenzymes*, benar-benar tidak dapat berfungsi dengan tidak adanya kalsium. α -amilase memotong karbohidrat rantai panjang pada lokasi acak di sepanjang rantai pati, yang pada akhirnya menghasilkan maltotriosa dan maltosa dari amilosa, atau maltosa, glukosa dan "limit-dextrin" dari amilopektin. α -amilase cenderung lebih cepat kerjanya dibanding β -amilase karena dapat bekerja di mana saja pada substrat. Secara

fisiologis pada manusia, baik amilase ludah dan pankreas adalah α -amilase. Juga ditemukan pada tumbuhan, jamur (ascomycetes dan basidiomycetes) dan bakteri (*Bacillus*) (Shipra *et al.*, 2011).

α -Amilase / α -amilase (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase) merupakan famili endoamilase yang secara acak mengkatalisis hidrolisis awal ikatan glikosidik α -(1,4) dalam pati menjadi oligosakarida lebih pendek dengan berat molekul yang rendah, seperti glukosa, maltosa, dan unit maltotriosa. (Pandey *et al.*, 2001 in Arunsasi *et al.*, 2010; Souza and Magalhaes, 2010; Mishra dan Dadhich, 2010). Produk akhir reaksi α -amilase adalah oligosakarida dengan berbagai panjang dengan konfigurasi- α , α -limit dekstrin, yang merupakan campuran maltosa, maltotriosa, dan oligosakarida bercabang yang terdiri dari 6-8 unit glukosa yang mengandung ikatan α -1,4 dan α -1,6 (Souza and Magalhaes, 2010).

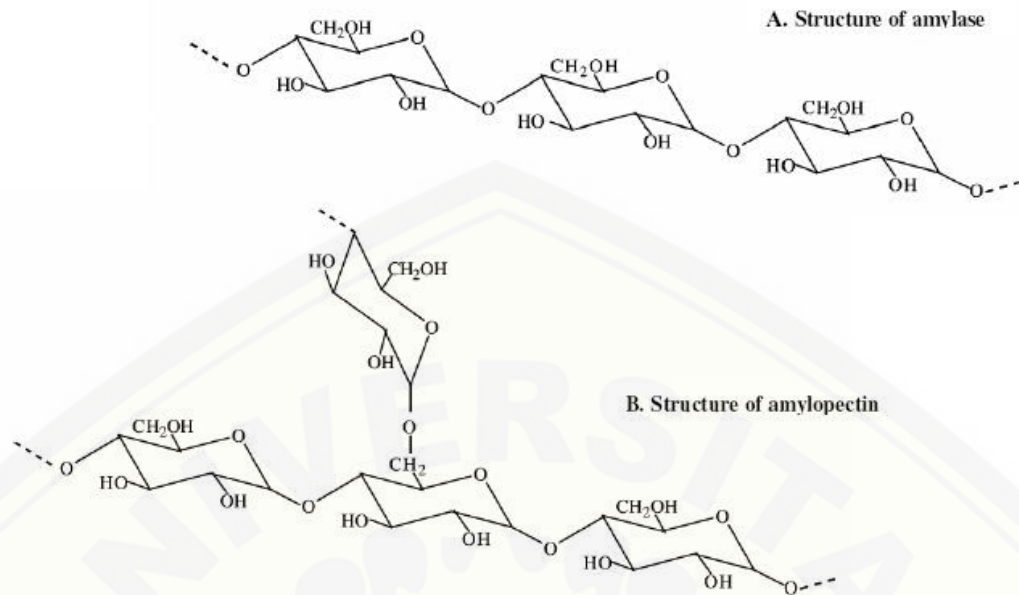
α -Amilase memiliki struktur tiga dimensi yang mampu mengikat substrat, oleh aksi yang sangat spesifik kelompok katalitik, menyebabkan kerusakan ikatan glikosidik. α -Amilase manusia merupakan enzim klasik yang mengandung kalsium yang terdiri dari 512 asam amino dalam satu rantai oligosakarida dengan berat molekul 57,6 kDa . Protein ini mengandung 3 domain: A, B, dan C (Gambar.2.4). Domain A adalah yang terbesar, menyajikan barel khas berbentuk super struktur (β/α). Domain B disisipkan antara domain A dan C dan melekat ke domain A dengan obligasi disulfida. Domain C memiliki Struktur terkait dengan domain A dengan rantai polipeptida sederhana dan tampaknya menjadi domain independen dengan fungsi yang tidak diketahui. Situs aktif (tempat mengikat substrat) dari α -amilase terletak di celah antara ujung karboksil dari domain A dan B. Kalsium (Ca^{2+}) Terletak di antara domain A dan B dan dapat bertindak dalam stabilisasi struktur tiga dimensi dan sebagai aktivator alosterik. Pengikatan analog substrat menunjukkan bahwa Asp206, Glu230 dan Asp297 berpartisipasi dalam katalisis. Situs ikatan substrat terdiri dari 5 *subsites* dengan situs katalitik diposisikan di *subsites* 3. Substrat dapat mengikat residu glukosa pertama pada *subsites* 1 atau 2, yang memungkinkan terjadinya pemotongan antara residu

glukosa pertama dengan kedua atau residu glukosa kedua dengan ketiga (Souza and Magalhaes, 2010).



Gambar 2.3 Struktur α -amilase (Souza and Magalhaes, 2010).

Pati merupakan sumber energi yang penting untuk manusia, hewan, tanaman dan mikroorganisme. Pati merupakan polimer glukosa yang dihubungkan satu sama lain melalui ikatan glikosidik. Dua jenis polimer glukosa hadir dalam pati yaitu amilosa dan amilopektin (Gambar 2.4). Amilosa dan amilopektin memiliki struktur yang berbeda. Amilosa (15-25% dari pati) merupakan polimer linear yang terdiri dari 6000 unit glukosa dengan ikatan glikosidik α - (1,4), sedangkan amilopektin (75-85% dari pati) terdiri dari α -(1,4) pendek yang terikat dengan rantai linear 10-60 unit glukosa dan α -(1,6) terikat dengan rantai samping yang terdiri dari 15-45 unit glukosa (LeVeque *et al.*, 2000, Bertoldo and Antranikian, 2002). Granul terikat pati sintase dapat memanjangkan maltooligosakarida membentuk amilosa dan dianggap bertanggung jawab untuk sintesis polimer ini. Pati sintase yang dapat larut dianggap bertanggung jawab untuk sintesis unit rantai amilopektin. α -Amilase mampu memotong ikatan glikosidik α -(1,4) yang ada di bagian dalam dari amilosa atau rantai amilopektin (Souza and Magalhaes, 2010).



Gambar 2.4 Dua jenis polimer glukosa yang ada dalam pati: (A) amilosa (B) amilopektin (Souza and Magalhaes, 2010).

2.3.2 α -Glukosidase

α -glukosidase adalah enzim yang berperan pada konversi karbohidrat menjadi glukosa. Karbohidrat akan dicerna oleh enzim di dalam mulut dan usus menjadi gula yang lebih sederhana yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh dan meningkatkan kadar gula darah. Proses pencernaan karbohidrat tersebut menyebabkan pankreas melepaskan α -glukosidase ke dalam usus yang akan mencerna karbohidrat menjadi oligosakarida yang kemudian akan diubah lagi menjadi glukosa oleh α -glukosidase yang dikeluarkan oleh sel-sel usus halus yang kemudian akan diserap ke dalam tubuh. Dengan dihambatnya kerja enzim α -glukosidase, kadar glukosa dalam darah dapat dikembalikan dalam batas normal (Bösenberg, 2008).

Senyawa-senyawa penghambat α -glukosidase bekerja menghambat α -glukosidase yang terdapat pada dinding halus. Enzim-enzim α -glukosidase (maltase, isomaltase, glukomaltase, dan sukrase) berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida pada dinding usus halus. Penghambatan kerja enzim ini secara

efektif dapat mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorpsinya, sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa *post-prandial* pada penderita diabetes. Senyawa penghambatan α -glukosidase juga menghambat enzim α -amilase pankreas yang bekerja menghidrolisis polisakarida di dalam lumen usus halus (Dirjen Binfar Depkes, 2005). Efek samping penghambatan α -glukosidase yaitu kembung, buang angin dan diare. Supaya lebih efektif harus dikonsumsi bersama makanan (Bösenberg, 2008).

Obat yang termasuk penghambat enzim α -glukosidase adalah *acarbose*, Miglitol dan Voglibose. Di Indonesia *Acarbose* telah dipasarkan dengan nama dagang Glucobay[®] dan Eclid[®]. *Acarbose* adalah suatu oligosakarida yang diperoleh dari proses fermentasi mikroorganisme, *Actinoplanes utahensis*, dengan nama kimia O-4,6-dideoksi-4[[*(1S,4R,5S,6S)*-4,5,6-trihidoksi-3-(hidroksimetil)-2-sikloheks-en-1-il]amino]- α -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 40-O- α -D-glukopiranosil-(1 \rightarrow 4)-D-glukosa. *Acarbose* merupakan serbuk berwarna putih dengan berat molekul 645,6, bersifat larut dalam air dan memiliki pKa 5,1.

Acarbose menghambat enzim α -glukosidase (maltase, isomaltase, glukomaltase dan sukrase) berfungsi untuk menghidrolisis oligosakarida pada dinding usus halus. Inhibisi kerja enzim ini secara efektif dapat mengurangi pencernaan karbohidrat kompleks dan absorpsinya, sehingga dapat mengurangi peningkatan kadar glukosa post prandial pada pasien diabetes. *Acarbose* juga menghambat enzim α -amilase pankreas yang bekerja menghidrolisis polisakarida di dalam lumen usus halus. *Acarbose* tidak merangsang sekresi insulin oleh sel-sel β -Langerhans kelenjar pankreas. Oleh sebab itu tidak menyebabkan hipoglikemia, kecuali diberikan bersama-sama dengan OHO (Obat Hipoglikemik Oral) yang lain atau dengan insulin.

2.4 Inhibitor Enzim

Berdasarkan reaksi kimianya, inhibitor dapat dibedakan menjadi 2, yaitu inhibitor *irreversible* dan inhibitor *reversible*. Inhibitor irreversibel adalah inhibitor yang reaksi kimianya berjalan satu arah atau tidak dapat balik, dimana

setelah inhibitor mengikat enzim, inhibitor tidak dapat dipisahkan dari sisi aktif enzim. Keadaan ini menyebabkan enzim tidak dapat mengikat substrat atau inhibitor merusak beberapa komponen (gugus fungsi) pada sisi katalitik molekul enzim. Inhibitor reversibel adalah inhibitor yang reaksi kimianya berjalan dua arah atau dapat balik, bekerja dengan mengikat sisi aktif enzim melalui reaksi reversibel dan inhibitor ini dapat dipisahkan atau dilepaskan kembali dari ikatannya.

Inhibitor reversibel terdiri dari tiga jenis, yaitu inhibitor yang bekerja secara kompetitif dan non kompetitif.

2.4.1 Inhibitor Kompetitif

Pada inhibitor kompetitif, inhibitor dan substrat berkompetisi untuk berikatan dengan enzim. Seringkali inhibitor kompetitif memiliki struktur yang sangat mirip dengan substrat asli enzim. Sebagai contoh, metotreksat adalah inhibitor kompetitif untuk enzim dihidrofolat reduktase. Pada inhibitor kompetitif, kelajuan maksimal reaksi tidak berubah, namun memerlukan konsentrasi substrat yang lebih tinggi untuk mencapai kelajuan maksimal tersebut, sehingga meningkatkan K_m .

2.4.2 Inhibitor Non Kompetitif

Inhibitor non kompetitif dapat mengikat enzim pada saat yang sama substrat berikatan dengan enzim. Baik kompleks EI dan EIS tidak aktif. Karena inhibitor tidak dapat dilawan dengan peningkatan konsentrasi substrat, V_{max} reaksi berubah. Namun, karena substrat masih dapat mengikat enzim, K_m tetaplah sama.

Pada penderita DM, penghambatan terhadap enzim yang berperan dalam hidrolisis karbohidrat menyebabkan penghambatan absorpsi glukosa sehingga menurunkan keadaan hiperglikemia setelah makan. Obat yang biasa diberikan pada penderita DM adalah Acarbose. Acarbose merupakan suatu oligosakarida yang diperoleh dari fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes utahensis*, memiliki berat molekul 645.6, larut air, dan mempunyai nilai pKa 5.1 (Info Obat Indonesia 2009). Calder dan Geddes (1989) meneliti bahwa *Acarbose* menghambat enzim α -glukosidase secara kompetitif.

Belakangan ini, berbagai jenis fitokimia telah dilaporkan memiliki daya hambat terhadap enzim. Banyak peneliti yang tertarik menguji berbagai jenis tanaman dan fitokimia yang dikandungnya dan diduga dapat menghambat kerja enzim. Senyawa fitokimia tersebut antara lain *dieckol* (sejenis florotanin) dari alga coklat *Ecklonia cava* yang dapat menghambat enzim α -amilase dan α -glukosidase (Lee *et al* 2010), *vasicine* dan *vasicinol* pada daun *Adhatoda vasica* Nees sebagai inhibitor enzim α -amilase, α -glukosidase, dan sukrase (Gao *et al.* 2008). Senyawa *rosmarinic acid*, quersetin, *protocatechuic acid*, dan *para-Coumaric acid* pada tanaman herbal oregano dilaporkan dapat menghambat *porcine* pankreas amilase *in vitro* (McCue *et al.* 2004). Ono *et al.* (2005) meneliti bahwa ekstrak daun *Nelumbo nucifera* mampu menghambat enzim pankreas amilase dan lipase, namun setelah komponen fenolik pada ekstrak tersebut dihilangkan, daya hambatnya menghilang. Kayu secang mengandung komponen kuersetin yang dapat berperan dalam inhibisi enzim α -amilase dan α -glukosidase (Cai *et al.* 2007).

Enzim α -glukosidase dapat dihambat secara efektif oleh naringenin, kaemferol, luteolin, apigenin, katekin dan epikatekin, diadzein dan epigalokatekin galat (Tadera *et al.* 2006). Berbagai kelas senyawa fenolik memang telah banyak diberitahukan sebagai inhibitor enzim α -glukosidase. McDougall *et al.* (2009) mengutarakan bahwa elagitanin, proantosianidin, dan polifenol pada buah berry (strawberry, claudberry, dsb) dapat menghambat enzim lipase. Shai *et al.* (2010) juga meneliti enam jenis tanaman obat yang tumbuh di Phalaborwa-Afrika Selatan, memiliki kemampuan menghambat *yeast alpha glucosidase* walaupun belum diteliti lebih lanjut senyawa bioaktif apa saja yang berperan dalam penghambatan tersebut.

2.5 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) merupakan tanaman *Gnetacea* asli Indo-Malaya (Kato, 2009; Kato, 2011). Area distribusi dari tumbuhan ini antara lain di Asia Tenggara dan Melanesia, Assam, Timur Laut India (Manner and Elevitch,

2006). Di Indonesia, daerah distribusi tanaman ini meliputi di Andaman, Sumatera dan Pulau Jawa (Manner and Elevitch,2006).

Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) merupakan tumbuhan yang termasuk dalam divisi Spermatophyta yang dapat ditemukan di Pulau Jawa. Melinjo mempunyai pohon yang ramping, tinggi mencapai 10-15 m; percabangan umumnya melingkar; daun lebar 4-7 cm, panjang 10-20cm, tumbuh berlawanan, bewarna hijau gelap, mengkilap, eliptik; buah ellipsoid, kulit tipis, panjang 1-3,5 cm, lebar setengah dari panjangnya, umumnya menggerombol, berubah dari kuning kemerah-orange dan menjadi ungu saat tua (Vasishta, 1983). Komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo and Aldino, 2007). Kandungan metabolit sekunder biji melinjo berupa saponin, tannin, dan flavonoid (Santoso *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2011; Pahursip and Sitanggang, 2011). Morfologi biji melinjo ditunjukkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.5 Buah Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) (Kato *et al.*, 2009)

2.5.1 Taksonomi

Melinjo merupakan tumbuhan berbiji terbuka (*Gymnospermae*). Menurut Tjitrosoepomo 2004, menyebutkan bahwa tanaman melinjo dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

- Kingdom : *Plantae*
Divisi : *Spermatophyta* (tumbuhan berbiji)
Sub Divisi : *Gymnospermae* (berbiji terbuka)
Kelas : *Gnetopsida*

Ordo : *Gnetales*
Famili : *Gnetaceae*
Genus : *Gnetum*
Spesies : *Gnetum gnemon L.*

2.5.2 Habitat

Tanaman melinjo dapat tumbuh pada tanah-tanah liat, berpasir dan berkapur, tetapi tidak tahan terhadap tanah yang tergenang air atau yang berkadar asam tinggi dan dapat tumbuh dari ketinggian 0 - 1.200 m dpl. Lahan yang akan ditanami melinjo harus terbuka atau terkena sinar matahari, lubang tanam berukuran 60 x 60 x 75 cm, dengan jarak tanam 6 - 8 m (Manner *et al.*, 2006).

Melinjo dapat ditemukan di daerah yang kering sampai tropis. Untuk tumbuh dan berkembang, melinjo tidak memerlukan tanah yang bernutrisi tinggi atau iklim khusus. Melinjo dapat beradaptasi dengan rentang suhu yang luas. Hal inilah yang menyebabkan melinjo sangat mudah untuk ditemukan di berbagai daerah kecuali daerah pantai karena tumbuhan ini tidak dapat tumbuh di daerah yang memiliki kadar garam yang tinggi. Di Indonesia tumbuhan melinjo tidak hanya dapat dijumpai di hutan dan perkebunan saja. Di beberapa daerah tumbuhan melinjo ditumbuhkan di pekarangan rumah atau kebun rumah dan dimanfaatkan oleh penduduk secara langsung.

2.5.3 Manfaat Tanaman Melinjo

Daun muda, perbungaan, tangkil, dan buah tua melinjo dimasak sebagai sayur (terutama sayur asem). Bijinya merupakan bagian yang terpenting, buahnya tidak lain dari biji yang terbungkus oleh kulit dalam yang kaku (kulit biji) dan kulit luar yang tipis dan dapat dimakan. Biji melinjo umumnya direbus atau dijadikan emping dan digoreng. Suatu macam serat yang berkualitas tinggi dihasilkan dari kulit batang bagian dalam, kulit ini dimanfaatkan sebagai tali panah yang terkenal di pulau Sumba, juga untuk tali pancing atau jaring, berkat ketahanannya terhadap air laut. Kayu melinjo tak ada manfaat yang khusus,

mungkin alasannya ialah karena kambium sekundernya membentuk struktur batang yang tidak normal (Asri,2010).

2.5.4 Kandungan Gizi Melinjo

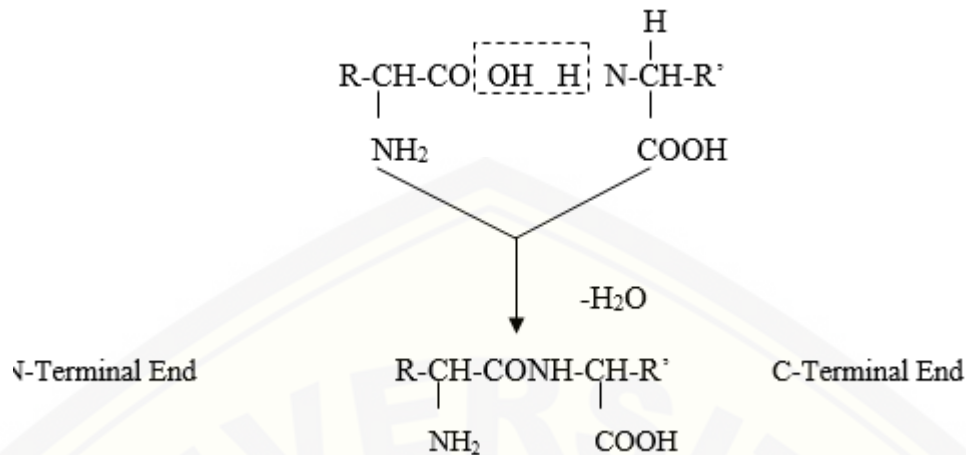
Tabel 2.4. Kandungan Gizi Melinjo

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

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI (1996).

2.6 Protein

Protein merupakan polipeptida berbobot molekul tinggi yang tersusun atas beberapa asam amino yang bergabung membentuk ikatan peptida (-CONH-). Pemisah antara polipeptida besar dan kecil biasanya berada di antara BM (berat molekul) 8000 dan 10.000. Semua asam amino (kecuali prolin) mempunyai struktur dasar yang sama, yaitu terdiri dari gugus karboksilat (-COOH), gugus amino (-NH₂), gugus R sebagai gugus fungsional (*side chain*) yang menentukan sifat kimiawi protein (Fatchiyah *et al.*, 2011). Struktur umum protein dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Pembentukan ikatan peptida diantara dua asam amino (Jain, 2005)

Selain ikatan peptide, protein juga mempunyai ikatan nonkovalen. Struktur tersier protein terbentuk melalui interaksi antara gugus R pada rantai polipeptida. Ikatan disulfida (HS-SH) merupakan ikatan kovalen yang dibentuk melalui ikatan nonkovalen baik sebagai nonpolar (hidrofobik) atau polar (ikatan hidrogen dan ionic) (Fatchiyah *et al.*, 2011).

2.6.1 Isolasi protein

Prinsip utama isolasi protein yaitu mendapatkan protein sesuai konfigurasi aslinya (*native state*) dan mempertahankan aktivitas biologinya (Englard dan Seifter, 1990). Oleh karena itu, dalam tata laksana isolasi protein harus memperhatikan kondisi fisika kimia dan karakteristik struktur protein (Maqueda *et al.*, 2013).

2.6.1.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah awal untuk mendapatkan sampel protein kasar dengan cara memisahkan protein dari berbagai substansi dalam sampel secara selektif (Berkelman dan Stenstedt, 1998; Maqueda *et al.*, 2013). Metode ekstraksi protein berdasarkan kelarutannya dibagi dalam empat fraksi yaitu protein larut air (albumin), protein larut garam (globulin), protein larut asam (glutein), dan protein larut alkohol (prolamin) (Ju *et al.*, 2011)

2.6.1.2 Presipitasi

Presipitasi bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi protein yang didapatkan (Maqueda *et al.*, 2013). Protein dapat dipresipitasi oleh adanya gangguan pelarut melalui perubahan PH, kekuatan ion, dan temperaturnya (Englard and Seifter, 1990).

a. Ammonium Sulfat

Presipitan garam yang sering digunakan untuk mempresipitasi protein dengan cara *salting out* (Englard and Seifter, 1990).

b. Pelarut organik

Pelarut organik menyebabkan protein mengendap dengan cara menurunkan konstanta dielektrik, yang meningkatkan interaksi antara protein dan protein. Semuanya larut dalam air, tetapi menghasilkan peningkatan temperatur yang signifikan. Seluruh pelarut organik cenderung mendenaturasi protein, khususnya temperatur di atas 0°C

c. Pengaturan pH

Daya larut protein tergantung pH dan mencapai minimum pada titik isoelektriknya (Bintang, 2010). Pada pH basa 8-9 kelarutan protein meningkat, karena interaksi elektrostatisnya menurun sehingga kondisi ini sangat baik untuk mengestrak protein. Pada pH asam 4-6 protein mengalami presipitasi, karena interaksi elektrostatis antar protein meningkat sehingga menurunkan interaksi dengan air (Salcedo-Chavez *et al.*, 2002)

2.6.2 Protein Terhidrolisis

Proses hidrolisis adalah proses pemecahan suatu molekul menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana dengan bantuan molekul air. Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana. Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- dan berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida serta rusaknya struktur globular protein (Nielsen, 2010).

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

2.6.2.1 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, selama beberapa jam. Menurut Girindra (2000), akibat samping yang terjadi dengan hidrolisis asam ialah rusaknya beberapa asam amino (triptofan, serin, dan treonin).

2.6.2.2 Hidrolisis Basa

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

2.6.2.3 Hidrolisis Enzimatik

Hidrolisis enzimatik dilakukan dengan menggunakan enzim. Dapat digunakan satu jenis enzim saja, atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Pada penambahan enzim perlu dilakukan pengaturan kondisi pH dan suhu optimal. Dibandingkan dengan hidrolisis secara kimia (menggunakan asam atau basa), hidrolisis enzimatik lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan asam amino dan asam-asam amino bebas serta peptida dengan rantai pendek yang dihasilkan lebih bervariasi, reaksi dapat dipercepat kira-kira 10^{12} sampai 10^{20} , tingkat kehilangan asam amino esensial lebih rendah, biaya produksi relatif lebih murah dan menghasilkan komposisi asam amino tertentu terutama peptida rantai pendek (dipeptida dan tripeptida) yang mudah diabsorpsi oleh tubuh (Winarno, 2004). Menurut Reed (2000), enzim proteolitik atau enzim protease adalah enzim yang dapat memecah molekul-molekul protein dengan cara menghidrolisis ikatan peptida menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana seperti proteosa, pepton, polipeptida, dipeptida, dan sejumlah asam-asam amino

Protein dengan berat molekul yang rendah dapat diperoleh dengan menghidrolisis protein secara enzimatik (Zhidong *et al.*, 2013). Selain itu juga memiliki struktur sekunder yang lebih sedikit dari pada sebelum dihidrolisis,

sehingga dapat memperbaiki fungsinya seperti meningkatnya kelarutan mendekati titik isoelektrik (Kong *et al.*, 2007), meningkatkan ketahanan terhadap panas (Molina Ortiz dan Wagner, 2002), emulsifikasi (Xiong *et al.*, 2008), dan meningkatkan pemutusan (Molina Ortiz dan Wagner, 2002), kemampuan tersebut menjadikan produk hidrolisis menguntungkan dalam aplikasi berbagai produk makanan (Muhamyankaka *et al.*, 2013). Hidrolisis protein menggunakan enzim proteolitik seperti alkalase, flavorzyme, protamex, dan neutrase yang memiliki perbedaan karakteristik pada produk hasil hidrolisisnya (Damrongsakkul *et al.*, 2008; You *et al.*, 2009; Yust *et al.*, 2010; Tsou *et al.*, 2010; Muhamyankaka *et al.*, 2013).

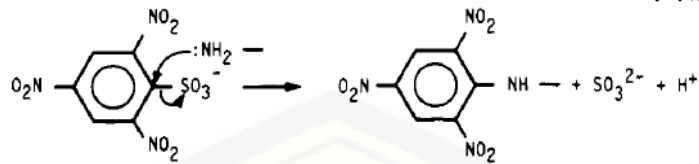
Alcalase adalah enzim alkaline yang diproduksi dari *Bacillus licheniform*, menurut Adler-Nissen (1986) protein yang dihidrolisis dengan *alcalase* memiliki perolehan protein yang paling tinggi (Hoo dan Babji, 2011). Parameter untuk memonitoring reaksi hidrolisis menggunakan derajat hidrolisis (DH),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

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

dimana h_{tot} merupakan jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein, dan h adalah jumlah ikatan hidrolisis, h_{tot} tergantung pada komposisi asam amino sebelum dihidrolisis (Nielsen *et al.*, 2001).

Beberapa metode untuk memonitoring DH selama hidrolisis protein yaitu pH-stat, *osmometry*, *soluble nitrogen content*, dan *trinitro-benzene-sulfonic acid* (TNBS) (Nielsen *et al.*, 2001). Metode TNBS didasarkan pada reaksi primer asam amino dengan reagen TNBS membentuk kromofor yang kemudian dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Adler-Nissen, 1979).

Reaksi reagen TNBS dengan asam amino ditunjukkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7. Reaksi reagen TNBS dengan asam amino (Adler-Nissen, 1979)

2.7 Analisis Kuantitatif Protein

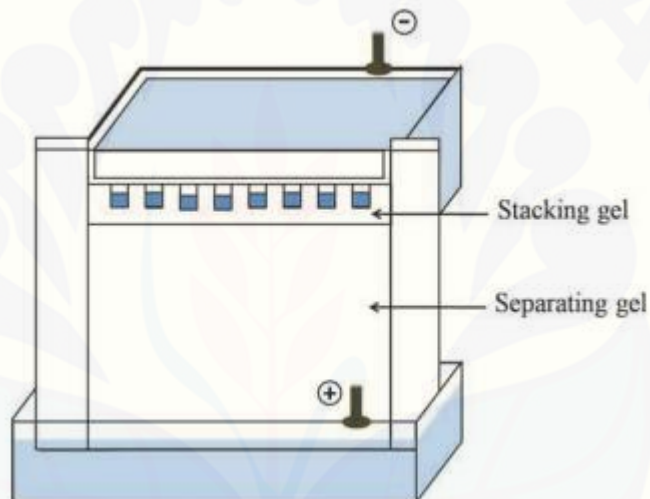
Metode yang sering digunakan untuk menentukan kadar protein yang didapat yaitu uji Bradford karena paling mudah, cepat, dan cukup akurat dibandingkan metode lainnya (Bradford, 1976). Metode ini menentukan kadar protein bukan dari ikatan peptidanya namun metode ini mendeteksi suatu asam amino spesifik yang berada di dalam protein tersebut dan berikatan dengan zat warnanya. Kelemahan uji Bradford yaitu reaksi terhambat jika di dalam sampel ada detergen dan memiliki rentang linier pada rentang pendek, biasanya 2-120 $\mu\text{g/mL}$, sehingga perlu pengenceran sampel sebelum analisis (Bintang, 2010). Penentuan kadar proteinnya, berdasarkan pengamatan absorbansi maksimum larutan *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 pada panjang gelombang 595 nm, ketika terjadi pengikatan protein. Pereaksi Bradford harus berwarna cokelat muda jernih (Bintang, 2010).

2.8 SDS-PAGE

Teknik SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*) digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan migrasi berat protein di dalam medan listrik (Sattayasai, 2012). Pemisahan secara elektroforesis hamper selalu dilakukan dalam gel poliakrilamida. Setelah protein didenaturasi dapat dipisahkan berdasarkan massanya dengan elektroforesis gel poliakrilamida (Stryer, 2000).

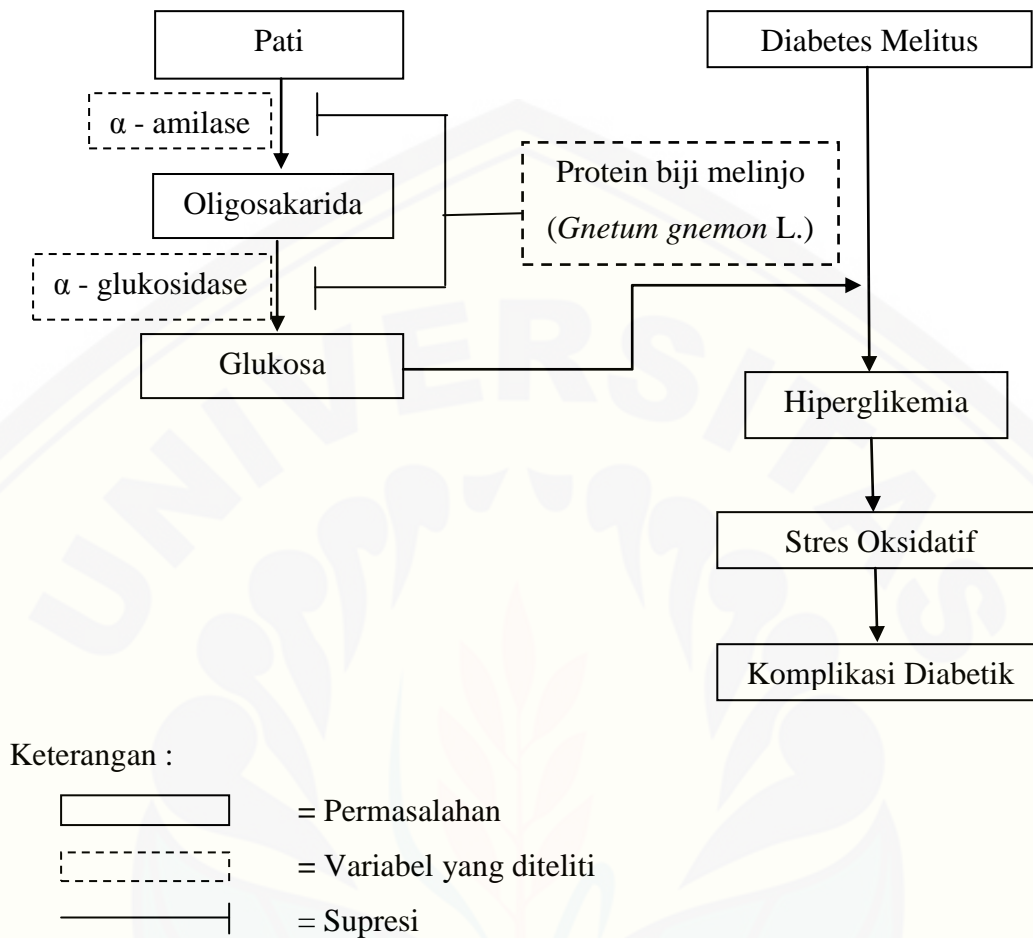
Campuran protein mula-mula dilarutkan dalam SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*), suatu detergen anionik yang akan memutus hamper semua interaksi kovalen dalam protein alami, juga ditambahkan merkptoetanol atau ditiotreititol

untuk mereduksi ikatan disulfida. Anion SDS akan berikatan pada rantai utama dengan perbandingan satu SDS untuk tiap dua residu asam amino, sehingga terbentuk kompleks SDS dengan protein terdenaturasi yang bermuatan negatif tinggi yang secara kasar sebanding dengan massa protein. Muatan negatif akibat pengikatan SDS ini umumnya lebih besar dari pada muatan protein alami, sehingga muatan protein alami ini menjadi tidak penting lagi. Kompleks SDS-protein yang telah terdenaturasi, kemudian dielektroforesis pada gel elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2.8. Protein dengan berat molekul kecil bergerak cepat dalam gel, sedangkan protein dengan berat molekul besar tinggal di atas, berdekatan dengan titik aplikasi campuran (Stryer, 2000).



Gambar 2.8 Pemasangan gel elektroforesis poliakrilamida (Sattayasai, 2012)

2.9 Kerangka Konseptual



Gambar 2.9 Skema kerangka konseptual

Pati akan terhidrolisis menjadi oligosakarida oleh α – amilase di saliva dan pankreas, oligosakarida tersebut dihidrolisis lebih lanjut oleh α – glukosidase di membran *brush border* intestinal menjadi glukosa. Glukosa yang terbentuk akan diabsorpsi oleh epithelium intestinal dan masuk ke peredaran darah sehingga dapat menyebabkan hiperglikemia. Hiperglikemia ini selanjutnya berakibat pada peningkatan stress oksidatif yang memicu terjadinya komplikasi diabetik baik komplikasi mikrovaskular maupun makrovaskular.

Untuk mencegah peningkatan glukosa di dalam darah diperlukan inhibitor enzim α – amilase dan α – glukosidase yang dapat ditemukan dalam protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*) sehingga pati tidak terhidrolisis menjadi glukosa.

2.10 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini adalah protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki aktivitas inhibisi terhadap α -amilase dan α -glukosidase secara *in vitro*.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian ekperimental yang bertujuan untuk mengetahui suatu gejala atau pengaruh yang timbul sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu. Penelitian ekperimental memiliki tujuan utama yaitu untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab akibat dengan cara mengadakan intervensi atau mengenakan perlakuan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen, kemudian hasil dari intervensi tersebut dibandingkan dengan kelompok yang tidak dikenakan perlakuan (kelompok kontrol). Jenis penelitian ekperimental yang digunakan adalah *True Experimental* (Notoadmojo, 2005).

3.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

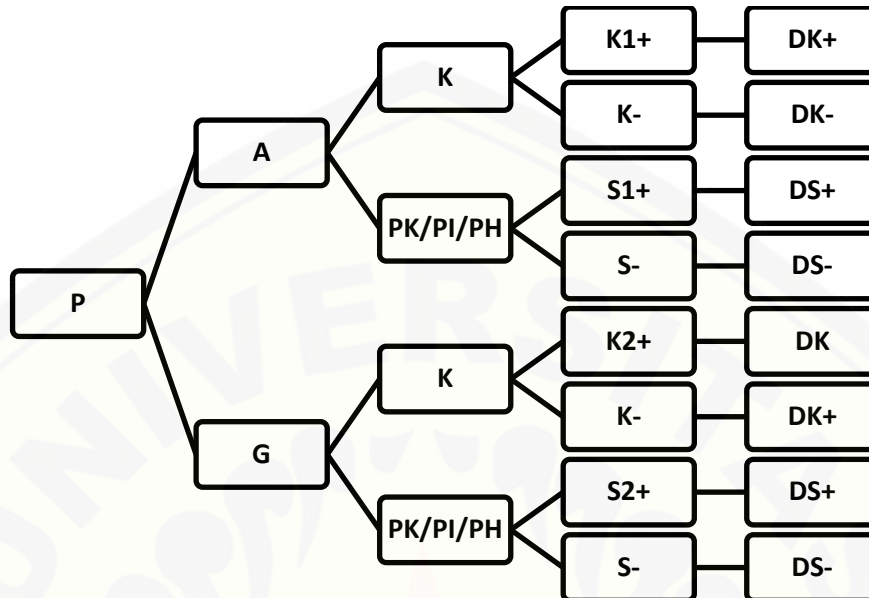
Penelitian ini seluruhnya dilakukan di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Waktu Penelitian pada bulan Januari – April 2015.

3.3 Sampel Penelitian

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

3.4 Rancangan Penelitian

Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

P : Uji Aktivitas Inhibitor

A : Enzim α -Amilase

G : Enzim α -Glukosidase

K : Kelompok Kontrol

K1+ : kelompok kontrol dengan pemberian akarbose 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

K2+ : kelompok kontrol dengan pemberian akarbose 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

K- : Kelompok kontrol dengan pemberian HCL 2 N (blangko)

DK+ : Hasil kelompok kontrol dengan pemberian akarbose

DK- : Hasil Kelompok kontrol dengan pemberian HCL 2 N (blangko)

PK : Perlakuan menggunakan Protein Kasar (PK)

PI : Perlakuan menggunakan Protein Isolat (PI)

PH : Perlakuan menggunakan Protein Terhidrolisis (PH)

S1+ : Kelompok perlakuan dengan pemberian PK/PI/PH 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

S2+ : Kelompok perlakuan dengan pemberian PK/PI/PH 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

- S- : Kelompok perlakuan dengan pemberian aquadest (blangko)
DS+ : Hasil kelompok perlakuan dengan pemberian PK/PI/PH
DS- : Hasil kelompok perlakuan dengan pemberian aquadest (blangko)

3.5 Alat Dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *waterbath*, inkubator (Carbolite), *microplate reader* (spektrofotometer Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), sertrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), *gel electrophoresis*, SDS-PAGE (Bio-rad), *dry block heater*, strirer, vortex, *microplate*, tabung reaksi, *ependorf*, *syringe* Hamilton, *micropipette* dan alat pendukung penelitian lainnya.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, 1 M NaOH, 1 M HCl, buffer fosfat pH 6,9, 1% *Soluble Starch* (wako) 191-03985, Pottasium Sodium Tartrate (wako) 191-03005, 96mM 3,5-Dinitrosalicylic acid (wako) 040-03642, enzim α -amilase *porcine pancreas* (Sigma A3176), enzim α -glukosidase *saccharomyces cerevisiae* (Sigma G0660-750UN), 1 M maltose, buffer fosfat pH 7, enzim *glucose oxidase*, enzim *peroxidase*, 4-aminoantipyrine, triton X-100, larutan phenol, 0,1 M buffer fosfat, phenol-buffer pH 7, 0,1 M Na₂SO₄, enzim Alkalase 24L FG (2,4 AU/g dan densitasnya 1,18 g/mL), *separating gel* 15%, *stacking gel*, larutan *staining*, larutan *destaining*, *running buffer*, *SDS-reducing buffer*, pereaksi Bradford, BSA (*Bovine Serum Albumin*), 0,1% TNBS, standart L-Leucin, dan marker protein (*ELPIS BIOTECH'S* EBM-1018 : 100 kDa, 70 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa dan 15 kDa).

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

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

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil persen (%) penghambatan aktivitas α -amilase dan α -glukosidase.

3.6.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah waktu inkubasi, cara ekstraksi sampel dan prosedur kerja.

3.7 Definisi Operasional

- a. Sampel biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) adalah sampel yang sudah masak secara fisiologis.
- b. Protein kasar (Gg-PK) adalah ekstrak kasar yang diperoleh dari biji melinjo yang telah dihaluskan yang kemudian dipisahkan antara pelet dan supernatan. Pengujian ini menggunakan protein kasar dari supernatan.
- c. Protein isolat (Gg-PI) adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang telah melalui proses pengeringan, kemudian serbuk yang dihasilkan dilarutkan kedalam aquades (perbandingan 1:3). Tahap selanjutnya, dilakukan pengisolasian protein dengan metode *isoelectric presipitation*.
- d. Protein terhidrolisis (Gg-PH) adalah protein yang diperoleh dari ekstraksi biji melinjo yang dihaluskan dan dilarutkan dengan aquadest (perbandingan 1:3), yang kemudian melalui proses pencernaan oleh alkalase dan dilakukan pengisolasian protein. Tujuan dari proses ini adalah untuk menghasilkan berat molekul protein yang lebih kecil.
- e. Pengujian penghambatan enzim α -amilase adalah uji untuk mengetahui efektivitas protein biji melinjo secara *in vitro* terhadap penurunan aktivitas enzim α -amilase dalam memecah pati sehingga hasilnya adalah penurunan daya cerna pati. Pati dihidrolisis oleh enzim α -amilase menjadi gula-gula sederhana. Semakin tinggi daya cerna suatu pati berarti semakin banyak pati yang dapat dihidrolisis dalam waktu tertentu yang ditunjukkan oleh semakin banyaknya glukosa dan maltosa yang

dihasilkan. Glukosa dan maltosa dapat bereaksi dengan DNS (asam dinitrosalisilat) sehingga kadar keduanya dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

- f. Pengujian penghambatan enzim α -glukosidase adalah uji untuk mengetahui penurunan glukosa aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase yang berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* secara *in vitro*. Maltosa sebagai substrat dihidrolisis oleh α -glukosidase menjadi glukosa dan glukosa. Glukosa tersebut direaksikan dengan *glucose oxidase* untuk menghasilkan asam glukonat dan hydrogen peroksida. Hydrogen peroksida tadi direaksikan dengan 4-aminoantipyrine, *phenol* dan *peroxidase* sebagai katalisnya untuk menghasilkan warna sehingga kadar glukosa tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm.

3.8 Prosedur Kerja

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

Bahan baku yang digunakan adalah 16 gram biji melinjo berwarna merah penuh yang diperoleh dari daerah Jember. Kulit biji melinjo dihilangkan dan biji dikeringkan pada oven dengan suhu 40 °C selama 18 jam. Biji kering dihilangkan lapisan kedua secara manual. Biji kering lapisan ketiga dihancurkan menjadi serbuk dengan menggunakan mortar dan pasir kuarsa untuk mempermudah pengestrakan kemudian di saring menggunakan penyaring dan dilarutkan dalam 48 ml aquadest (perbandingan 1:3). Selanjutnya, larutan tersebut dimasukkan ke dalam tube dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15 °C. Supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar (Gg-PK) biji melinjo.

3.8.2 Isolasi Protein (Gg-PI) Biji Melinjo

Isolasi protein menggunakan metode presipitasi isoelektrik seperti yang dijelaskan Salcedo-Chavez et al. (2002) dengan sedikit modifikasi. Gg-PK diatur

pHnya menjadi 4 dengan penambahan 1 N HCl, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15°C. Peletnya diambil dan supernatannya dibuang, kemudian diresuspensikan dengan aquadesr serta diatur pHnya menjadi pH 8 dengan menambahkan 1 N NaOH, hasilnya disebut protein isolat (Gg-PI). Setelah itu, sampel disimpan pada suhu -80°C sampai digunakan lebih lanjut.

3.8.3 Hidrolisis Enzimatik Protein Isolat

Hidrolisis protein isolat (protein Gg-PI) dengan menggunakan *alcalase* dengan perbandingan E/S (Enzim/Substrat) 0,2% pada kondisi suhu 50°C pada pH 8 selama 7-8 jam (Siswoyo *et al.*, 2012). Gg-PI sebanyak 12,5 mL (total protein 73 mg) digunakan sebagai bahan hidrolisis enzimatik dengan menambahkan *alcalase* sebanyak 146 µL yang sudah diencerkan 10x dari stok *Alcalase* 24 FLG menggunakan buffer fosfat 0,2 N pH 7,4. Setelah itu di inkubasi 50°C selama 7 jam. Kemudian dipanaskan kembali selama 10 menit pada suhu 95°C untuk menginaktivasi enzim. Setelah itu hasilnya disentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit dalam suhu 15°C. Bagian supernatan yang kemudian akan dianalisis sebagai Protein Terhidrolisis (Gg-PH). Setelah itu, sampel disimpan pada suhu -80°C sampai digunakan lebih lanjut.

3.8.4 Penentuan Total Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan metode Bradford (1970) dalam Deutcher (1990). Sebanyak 5 µl sampel ditambahkan dengan 45 µl aquadest dan ditambah dengan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Hasil yang didapat dibandingkan dengan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) untuk mengetahui konsentrasi protein terlarut.

3.8.5 Pengukuran Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan TNBS (Adler-Nissen, 1979). Jumlah total asam α-amino ditentukan dalam sampel (Gg-PI) dengan cara dihidrolisis secara asam (6 N HCl pada 110°C selama 12 jam). Sampel 25 µL (Gg-

PI yang telah terhidrolisis asam dan Gg-PH) masing-masing dicampur dengan 400 μL 0,2 N buffer fosfat (pH 8) dan 200 μL 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50⁰C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400 μL 0,1 N Na₂SO₃ lalu didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya pada 420 nm. Kurva standart L-leucine digunakan sebagai mengetahui konsentrasi asam amino. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan : $DH = h/h_{\text{tot}} \times 100\%$; dimana h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

3.8.6 Elektroforesis SDS-PAGE

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

SDS-reducing buffer ditambahkan ke dalam sampel protein 1:1 (v/v) dalam tabung *eppendorf* kemudian dipanaskan pada suhu 96⁰C selama 3 menit. Sampel Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH yang sudah ditambahkan SDS-reducing buffer dengan jumlah protein yang sama yaitu 40,7 μg serta marker protein sebanyak 5 μL dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan *siringe* Hamilton, kemudian *dirunning* pada 25-80 volt sampe *tracking dye* mencapai jarak 0,5 cm dari dasar gel. Setelah selesai, *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate*.

Gel direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang pada kecepatan 36 rpm selama 30 menit untuk mewarnai pita protein. Setelah itu, larutan *staining* dituang kembali pada wadahnya kemudian dicuci dengan aquadest. Pencucian gel dilakukan dengan merendam gel di dalam larutan *destaining* dan dipanaskan menggunakan *microwave* pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ selama 20 detik, kemudian digoyang

pada kecepatan 36 rpm selama \pm 2 menit. Proses pencucian dilakukan 2-3 kali atau sampai pita protein terlihat jelas. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan antara pola protein sampel dengan marker protein yang telah diketahui berat molekulnya.

3.8.8 Penghambatan enzim α -amilase

Pengukuran penghambatan enzim α -amilase dilakukan berdasarkan prosedur penelitian Thalapaneni *et al.* (2008). Larutan enzim α -amilase yang digunakan adalah enzim *porcine pancreatic amylase* 2,16 unit/ml sebanyak 30 μ L. Campuran reaksi terdiri dari kontrol blanko (B_0), blanko (B_1), kontrol sampel (S_0), sampel (S_1) dengan konsentrasi 50 μ g/mL. Kemudian campuran reaksi di pre-inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, larutan *soluble starch* 1% (b/v) ditambahkan sebanyak 250 μ L dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah inkubasi kedua, dididihkan selama 1 menit untuk menginaktivasi enzim. Ambil 100 μ L dari larutan tersebut dan tambahkan 50 μ L DNS lalu dididihkan kembali selama 15 menit. Setelah dididihkan dinginkan dengan suhu ruangan dan tambahkan aquadest 450 μ L, ukur absorbansi nya dengan panjang gelombang 540 nm. Kontrol positif yang digunakan adalah *acarbose* dengan konsentrasi 50 μ g/mL yang diperoleh dari tablet Glucobay (50 mg acarbose).

Buffer Phosphat Saline dibuat dari larutan *sodium dihydrogenphosphate dehydrate* 20 mM dan sodium chloride 6,7 mM , campurkan dua reagen tersebut dengan aquadest sampai 100 ml. setelah itu atur sampai pH 6.9 dengan penambahan NaOH 1 M. Soluble strach 1% (b/v) dibuat dari 0.25 gram *soluble starch* dilarutkan dengan 25 ml *buffer phosphate saline*, kemudian dididihkan selama 15 menit dan setelah dingin ditepatkan ke volume awal dengan penambahan aquadest. Pereaksi DNS 96 mM dibuat dengan melarutkan 438 mg asam 3,5-dinitrosalisilat ke dalam 20 ml aquadest. Larutan DNS tersebut kemudian dicampurkan dengan larutan *potassium sodium tartrate* , yang dibuat dari 12 gram *potassium sodium tartrate* dalam 8 mL 2 M NaOH. Volume

campuran larutan tersebut kemudian ditepatkan sampai 40 ml dengan penambahan aquadest.

Tabel 3.1 menunjukkan kombinasi jumlah sampel, buffer phosphate saline, dan enzim yang diberikan pada kontrol blanko (B_0), blanko (B_1), kontrol sampel (S_0), sampel (S_1). Acarbose diberi perlakuan yang sama seperti sampel. Pengujian larutan blanko dan control blanko dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim tanpa adanya sampel sebagai inhibitor. Hal ini dilakukan karena penyimpanan larutan enzim dapat menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim. Pengujian larutan sampel dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak, sedangkan pengujian kontrol sampel dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel. Begitu juga dengan pengujian akarbose sebagai larutan pembanding untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim oleh akarbose, dan pengujian kontrol pembanding akarbose dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap akarbose.

Tabel 3.1 Jumlah larutan pada analisis aktivitas penghambatan α -amilase

Larutan	B_0 (μ l)	B_1 (μ l)	S_0 (μ l)	S_1 (μ l)
Sampel	-	-	100	100
Pelarut sampel	100	100	-	-
Buffer Phospat Saline	150	-	150	-
Enzim	-	150	-	150
Substrate soluble	250	250	250	250
DNS	50	50	50	50
Aquadest	450	450	450	450

Aktivitas penghambatan ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

Keterangan : A_1 = Absorbansi blanko (B_1) – Absorbansi kontrol blanko (B_0)

A_2 = Absorbansi sampel (S_1) – Absorbansi kontrol sampel (S_0)

3.8.9 Penghambatan enzim α -glukosidase

Pengukuran penghambatan enzim α -glukosidase dilakukan berdasarkan prosedur penelitian Mayur *et al.* (2010). Enzim α -glukosidase yang digunakan berasal dari *Saccharomyces cerevisiae* dengan aktivitas 1 unit/ml. Campuran reaksi terdiri dari kontrol blanko (B_0), blanko (B_1), kontrol sampel (S_0), sampel (S_1) dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kemudian campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, lalu dididihkan selama 3 menit pada suhu 90°C. Buffer phenol pH 7 ditambahkan sebanyak 750 μl dan tambahkan 5 μL *peroxidase* (0,5 unit/ μL), 5 μL 4-Aminoanthypirin, 5 μL *glucose oxidase* (0,8 unit/ μL). Setelah itu inkubasi kembali pada suhu 37°C selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 505 nm. Kontrol positif yang digunakan adalah *acarbose* dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yang diperoleh dari tablet Glucobay (50 mg *acarbose*).

Buffer kalium fosfat dibuat dari larutan kalium fosfat monobasik 0.1 M (13.609 gram dilarutkan dalam 1 liter aquadest) dan dinaikkan pH nya menjadi 7 dengan penambahan NaOH 1 M. Substrat maltose 1 M dibuat dengan menimbang 0,342 gram dalam 1 mL aquadest. Buffer phenol dibuat dari 1,36 gram KH_2PO_4 yang dilarutkan dengan 80 mL aquadest, 3 mL larutan phenol (50 mg/mL) yang terbuat dari 5 gram phenol dilarutkan dalam 100 ml aquadest, 3 mL triton X-100 (50 mg/mL) yang terbuat dari 5 gram triton X-100 dan dilarutkan dalam 100 mL aquadest, campuran tersebut diatur pHnya sampai 7 dengan menambahkan 1M NaOH dan larutkan sampai 100 ml dengan aquadest. Aminoanthypirin (4mg/mL) dibuat dengan menimbang 0,2 gram 4-aminoanthypirin yang dilarutkan dalam 50 ml aquadest,

Tabel 3.2 menunjukkan kombinasi jumlah sampel, buffer kalium fosfat, dan enzim yang diberikan pada kontrol blanko (B_0), blanko (B_1), kontrol sampel (S_0), sampel (S_1). *Acarbose* diberi perlakuan yang sama seperti sampel. Pengujian larutan blanko dan kontrol blanko dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim tanpa adanya sampel sebagai inhibitor. Hal ini dilakukan karena penyimpanan larutan enzim dapat menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas enzim.

Pengujian larutan sampel dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim oleh ekstrak, sedangkan pengujian kontrol sampel dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap larutan sampel. Begitu juga dengan pengujian akarbose sebagai larutan pembanding untuk mengetahui kemampuan penghambatan aktivitas enzim oleh akarbose, dan pengujian kontrol pembanding akarbose dilakukan sebagai faktor koreksi terhadap akarbose.

Tabel 3.2 Jumlah larutan pada analisis aktivitas penghambatan α -glukosidase

Larutan	B ₀ (μl)	B ₁ (μl)	S ₀ (μl)	S ₁ (μl)
Sampel	-	-	55	55
Pelarut sampel	55	55	-	-
Substrat Maltosa	100	100	100	100
Buffer Kalium Fosfat	55	45	55	45
Enzim α -glukosidase	-	10	-	10
Buffer Phenol	675	675	675	675
<i>Peroxidase</i>	5	5	5	5
Aminoanthypirin	5	5	5	5
<i>Glucose oxidase</i>	5	5	5	5

Aktivitas penghambatan ekstrak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

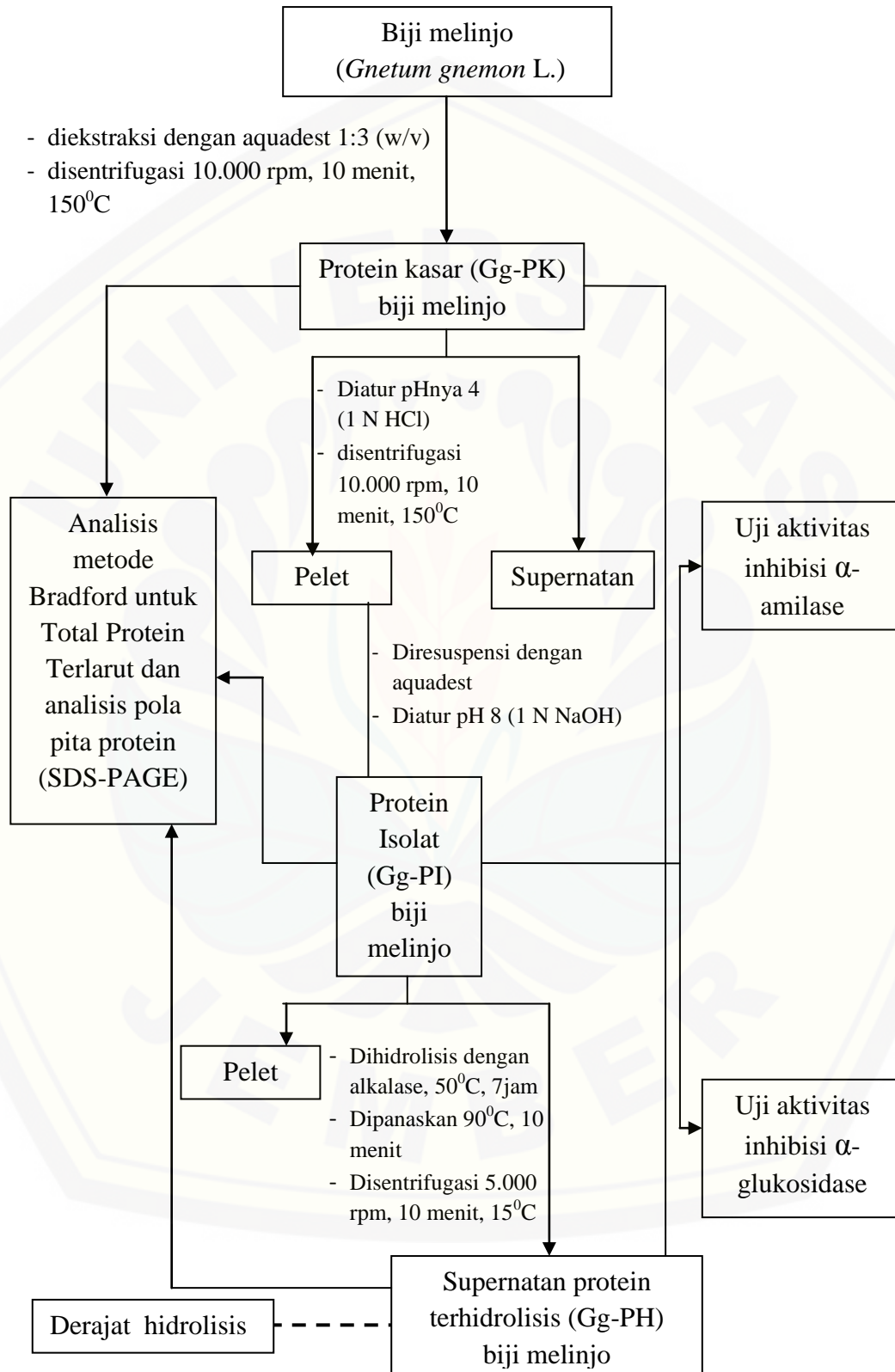
Keterangan : A₁ = Absorbansi blanko (B₁) – Absorbansi kontrol blanko (B₀)

A₂ = Absorbansi sampel (S₁) – Absorbansi kontrol sampel (S₀)

3.9 Analisis Statistik

Analisis statistik menggunakan uji normalitas, setelah itu dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel yang diambil variannya sama. Jika populasi terdistribusi normal dan homogeny ($p > 0,05$) dilakukan uji statistik *one way ANOVA* untuk membandingkan antar perlakuan. Namun jika tidak sama ($p < 0,05$) maka dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis*.

3.10 Alur Penelitian



3.11 Persetujuan Etik

Penelitian ini diajukan ke komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk mendapatkan masukan dan izin penelitian. Penelitian ini akan dilaksanakan setelah mendapat izin dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Protein Kasar Biji Melinjo (Gg-PK)

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah 16 gram biji melinjo yang masak secara fisiologi, ditandai dengan kulit luar berwarna merah penuh. Kulit biji melinjo dihilangkan, kemudian lapisan kedua biji dihilangkan secara manual. Biji lapisan ketiga dihaluskan dengan mortir, kemudian disaring dengan menggunakan kain kasa berukuran 100 mesh dan dilarutkan dalam 48 ml aquadest. Selanjutnya, larutan tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15⁰ C untuk memisahkan bagian tidak terlarut. Bagian terlarut (supernatan) ini yang selanjutnya disebut sebagai protein kasar (Gg-PK). Protein kasar yang diperoleh sebanyak 42,5 mL dan total protein 197,9 mg.

4.2 Isolasi Protein Biji Melinjo (Gg-PI)

Isolasi protein pada biji melinjo dilakukan dengan metode *isoelectric presipitation* seperti yang dijelaskan Salcedo-Chavez *et al.* (2002) dengan sedikit modifikasi. Supernatan hasil sentrifugasi dari proses ekstraksi biji melinjo sebanyak 42,5 mL diatur pHnya mencapai pH 4 dengan menambahkan 1 N HCl. Pada pH ini sebagian besar protein akan mengendap dititik isoelektriknya akibat peningkatan interaksi elektrostatis antar molekul protein sehingga interaksi elektrostatis protein dengan air mengalami penurunan (Salcedo-Chavez *et al.*, 2002). Setelah itu, dilakukan pemisahan bagian terlarut menggunakan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4⁰ C. Bagian tidak terlarut (pelet) dilarutkan dengan aquadest sebanyak 11,5 mL dan diatur pHnya sampai pH 8-9 dengan menggunakan 1 N NaOH. Proses ini menghasilkan protein isolate biji melinjo (Gg-PI) sebanyak 12,5 mL dengan total protein 73 mg. Hasil produksi bertahap Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH dapat dilihat pada Tabel 4.1.

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

Sampel Uji	Volume (mL)	Konsentrasi (mg/mL)	Total Protein (mg)	Recovery (%)*
Gg-PK	42,5	4,66 ± 0,05	197,9	100
Gg-PI	12,5	5,84 ± 0,21	73	36,8
Gg-PH	6,4	2,88 ± 0,01	18,4	9,3

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

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

Protein isolate (Gg-PI) merupakan material awal yang bagus untuk memproduksi protein hidrolisat, ini dikarenakan konsentrasi protein yang tinggi memberikan peluang yang besar bagi enzim *alcalase* untuk memotong ikatan peptida kompleks sehingga menurunkan berat molekul dan meningkatkan kemampuan fungsional protein seperti meningkatkan derajat kelarutan titik isoelektrik dan lebih stabil terhadap pemanasan tanpa mempengaruhi nutrisi yang terkandung didalamnya (Zhidong *et al.*, 2013). Hidrolisis enzimatik menggunakan *alcalase* bisa mendapatkan protein hidrolisat yang berat molekulnya relatif lebih kecil karena sisi pemotongan ikatan peptida memiliki spectrum yang lebih luas dibandingkan dengan beberapa enzim seperti tripsin yang hanya memotong ikatan peptida dengan gugus fungsional arginin dan lisin, sedangkan *alcalase* memotong ikatan peptida pada gugus hidrofobik seperti alanin, prolin, fenilalanin, leusin, prolin, dan isoleusin (Sujith dan Hymavathi, 2011).

Produksi protein hidrolisat (protein Gg-PH) dilakukan dengan menghidrolisis protein isolat (protein Gg-PI) dengan menggunakan *alcalase* dengan perbandingan E/S (Enzim/Substrat) 0,2% pada kondisi suhu 50°C pada pH 8 selama 7-8 jam (Siswoyo *et al.*, 2012). Material awal Gg-PI sebanyak 12,5 mL (total protein 73 mg) digunakan sebagai bahan hidrolisis enzimatik dengan menambahkan *alcalase* sebanyak 146 µL yang sudah diencerkan 10x dari stok *Alcalase* 24 FLG menggunakan buffer fosfat 0,2 N pH 7,4. Proses hidrolisis Gg-PI oleh *alcalase* menghasilkan produk berupa campuran peptida dan asam-asam

amino bebas (Gg-PH) melalui pemecahan ikatan peptida. Inaktivasi enzim dilakukan melalui inkubasi hidrolisat pada suhu 95°C selama 10 menit.

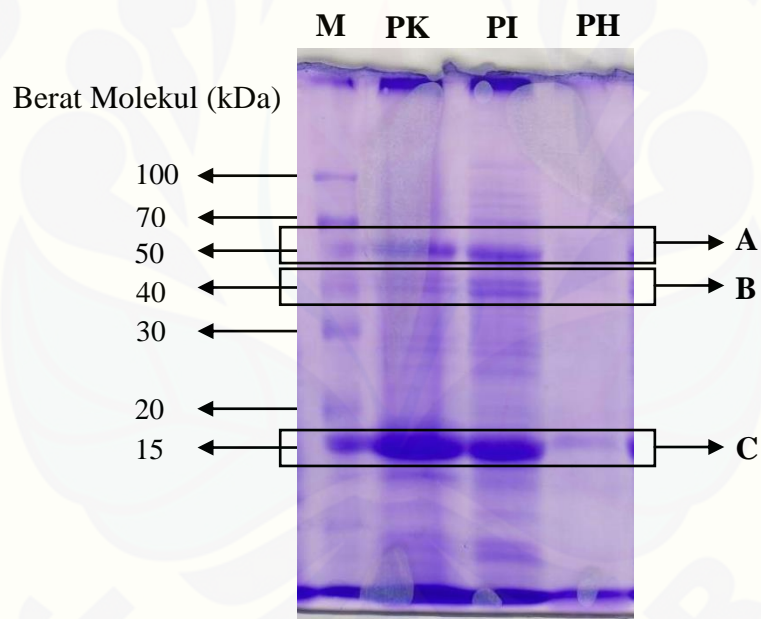
Selanjutnya protein terhidrolisis yang terbentuk dipisahkan antara pelet dan supernatan secara sederhana dengan sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 15°C. Supernatan ini yang selanjutnya disebut dengan protein terhidrolisis (Gg-PH). Protein hidrolisat yang diperoleh dalam proses ini sebanyak 6,4 mL dan total protein 18,4 mg.

Derajat hidrolisis (DH) digunakan untuk memonitoring reaksi hidrolisis dalam memotong ikatan peptida. Metode TNBS dipergunakan dalam penentuan derajat hidrolisis, dimana reaksi primer asam amino dengan reagen TNBS membentuk kromofor yang kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ) 420 nm, sehingga semakin banyak konsentrasi peptida atau asam amino maka intensitas warna makin kuat dan absorbansinya makin tinggi (Adler-Nissen, 1979). Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan mengetahui total asam amino dari sampel awal Gg-PI dan total asam amino dari sampel terhidrolisis Gg-PH. Total asam amino didefinisikan sebagai 100% sampel terhidrolisis dengan menggunakan perlakuan 6 N HCl pada 110°C selama 12 jam di dalam vacuum oven (Chel-Guerrero *et al.*, 2012). Penggunaan asam dan suhu ekstrim tersebut mampu memotong seluruh ikatan peptida pada protein Gg-PI, kemudian setelah Gg-PI dihidrolisis secara asam dianalisis konsentrasi asam aminonya beserta sampel Gg-PH menggunakan metode TNBS. Hasil perhitungan derajat hidrolisis (DH) *Alcalase* dalam menghidrolisis Gg-PI sebesar 40,6%, tingginya derajat hidrolisis menunjukkan bahwa peptida atau asam amino yang terbentuk semakin banyak sehingga menghasilkan protein hidrolisat dengan berat molekul lebih kecil.

4.4 Pola Pita Protein Biji Melinjo pada Elektroforesis SDS-PAGE

Elektroforesis adalah suatu proses migrasi atau perpindahan molekul bermuatan didalam suatu media bermuatan listrik, dimana kecepatan migrasinya bergantung kepada muatan, ukuran, dan bentuk setiap molekul yang terlibat. Pada saat arus listrik diberikan, molekul bermigrasi melalui media gel, molekul yang

lebih kecil akan bermigrasi lebih cepat, sehingga terjadi pemisahan (Dunn, 1989). Metode paling umum untuk memisahkan protein adalah dengan cara elektroforesis menggunakan *discontinuous polyacrylamide gel* sebagai medium penyangga dan *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) untuk mendenaturasi protein. Fungsi dari elektroforesis adalah untuk mengetahui pola protein yang terdapat pada biji melinjo dan mengetahui berat molekul dari protein yang terkandung didalamnya. Proses hidrolisis protein bertujuan untuk menurunkan berat molekul protein melalui pemotongan ikatan peptida, hal ini dapat dilihat dari profil proteinnya pada jumlah protein yang sama, yaitu sebesar 40,7 µg. Hasil SDS PAGE pada protein biji melinjo Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH dapat dilihat pada gambar 4.1.



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

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

Protein	Rf	BM	PK	PI	PH
A	0,33	±50 kDa	++	++	-
B	0,41	±40 kDa	+	+	-
C	0,71	±15 kDa	+++	+++	+

Keterangan :

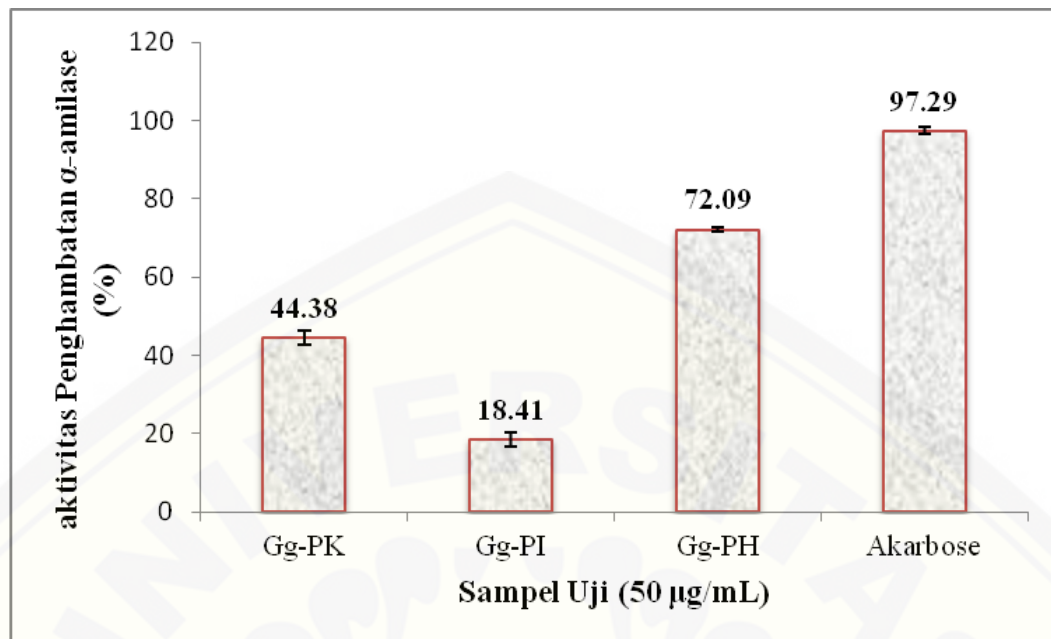
- (-) Tidak ada pita
- (+) Ada pita (tidak jelas)
- (++) Ada pita (jelas)
- (+++) Ada pita (sangat jelas)

Gambar 4.1 diatas menjelaskan hasil elektroforesis pada protein biji melinjo Gg-PK, Gg-PI, dan Gg-PH. Pada Gg-PK dan Gg-PI terdapat tiga pita protein yang mendominasi dengan perkiraan berat sebesar 50 kDa dan 40 kDa, serta berat 15 kDa. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya, bahwa protein yang mendominasi pada perkiraan berat 15 kDa (Siswoyo *et al.*, 2014). Kesamaan profil pita protein pada Gg-PK dan Gg-PI menunjukkan bahwa Gg-PI tidak mengalami modifikasi struktur protein melainkan hanya peningkatan konsentrasi protein yang didapat melalui metode isoelektrik presipitation. Profil pita Protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) didominasi oleh berat molekul 15 kDa dan tidak terdapat pita protein dengan berat 50 kDa dan 40 kDa. Protein 50 kDa dan 40 kDa yang menghilang menunjukkan bahwa adanya proses pencernaan oleh enzim *alcalase*, ditandai dengan perubahan berat molekul protein menjadi lebih kecil sebesar 15 kDa atau lebih kecil. Hidrolisis enzimatik bekerja dengan memotong protein tanpa merusak kandungan asam amino didalamnya. Hidrolisis enzimatik meningkatkan asam amino bebas yang ditunjukkan dengan modifikasi struktur protein dengan berat molekul yang lebih kecil (Carthy *et al.*, 2013). Hidrolisis ikatan peptida akan menyebabkan beberapa perubahan pada protein, yaitu meningkatkan kelarutan karena bertambahnya kandungan NH_3^+ dan COO^- dan berkurangnya berat molekul protein atau polipeptida serta rusaknya struktur globular protein (Pace *et al.*, 2004)

4.5 Uji Aktivitas Penghambatan α -Amilase

α -Amilase / α -amilase (α -1,4-glukan-4-glukanohidrolase) merupakan famili endoamilase yang secara acak mengkatalisis hidrolisis awal ikatan glikosidik α -(1,4) dalam pati menjadi oligosakarida lebih pendek dengan berat molekul yang rendah, seperti glukosa, maltosa, dan unit maltotriosa (Pandey *et al*, 2001 in Arunsasi *et al*, 2010; Souza & Magalhaes, 2010; Mishra & Dadhich, 2010). Produk akhir reaksi α -amilase adalah oligosakarida dengan berbagai panjang dengan konfigurasi- α , α -limit dekstrin, yang merupakan campuran maltosa, maltotriosa, dan oligosakarida bercabang yang terdiri dari 6-8 unit glukosa yang mengandung ikatan α -1,4 dan α -1,6 (Souza *and* Magalhaes, 2010).

Pengujian inhibisi enzim α -amilase adalah uji untuk mengetahui penurunan aktivitas enzim α -amilase dalam memecah pati sehingga hasilnya adalah penurunan daya cerna pati. Pati dihidrolisis oleh enzim α -amilase menjadi gula-gula sederhana. Semakin tinggi daya cerna suatu pati berarti semakin banyak pati yang dapat dihidrolisis dalam waktu tertentu yang ditunjukkan oleh semakin banyaknya glukosa dan maltosa yang dihasilkan. Glukosa dan maltosa dapat bereaksi dengan DNS (asam dinitrosalisilat) sehingga kadar keduanya dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm. Semakin kecil nilai absorbansi maka semakin besar persen inhibisi sampel, begitu juga sebaliknya. Hal ini juga dapat ditentukan dengan intensitas warna kuning yang terjadi terhadap maltosa yang bereaksi dengan DNS. Semakin berkurang intensitas warna kuning yang terjadi maka semakin sedikit maltosa yang terbentuk sehingga persen inhibisi semakin tinggi.



Gambar 4.2 Aktivitas Penghambatan α -Amilase pada Berbagai Sampel Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Pada gambar 4.2 menunjukkan hasil pengujian masing-masing jenis protein terhadap α -amilase dengan konsentrasi yang sama (50 µg/mL) yaitu protein kasar (Gg-PK) memiliki aktivitas penghambatan mencapai $44,38 \pm 1,87\%$, protein isolat (Gg-PI) mencapai $18,41 \pm 1,78\%$, dan protein terhidrolisis (Gg-PH) mencapai $72,09 \pm 0,58\%$ sedangkan akarbose sebagai kontrol positif memiliki aktivitas penghambatan mencapai $97,29 \pm 0,89\%$.

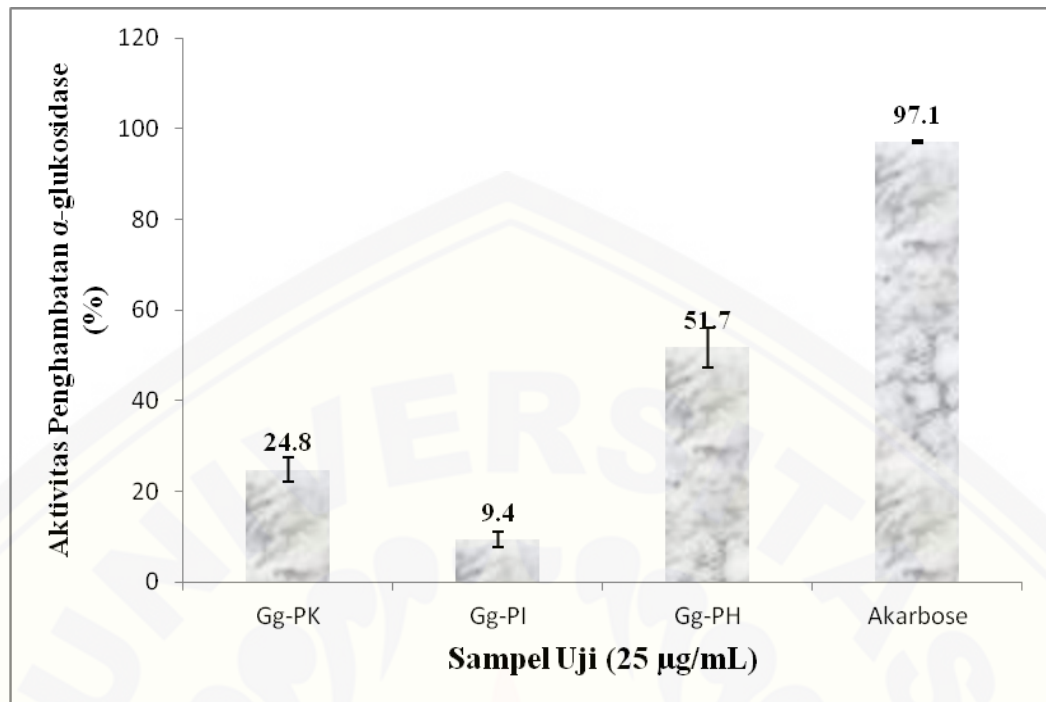
Analisis data menggunakan software IBM SPSS 21. Data diuji menggunakan uji *One Way* ANOVA (lampiran D). Uji *One Way* ANOVA dilakukan untuk menguji data apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara signifikan (nyata) atau tidak. Hasil uji menunjukkan angka signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh dari pemberian sampel uji protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap aktivitas enzim α -amilase.

4.6 Uji Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase

α -glukosidase adalah enzim yang mengkatalis pemotongan ikatan glikosidik pada oligosakarida. Beberapa glukosidase yang bekerja spesifik dalam memotong ikatan glikosidik bergantung pada jumlah, posisi, atau konfigurasi grup hidroksil di dalam molekul gula (de Melo *et al.*, 2006). Oleh karena itu pada kondisi hiperglikemia dimana konsentrasi gula pada darah tinggi melebihi normal seperti yang terjadi pada penderita diabetes, penghambatan aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase dapat membantu mengatasi kondisi hiperglikemia karena jumlah monosakarida yang dapat diserap oleh usus menjadi berkurang.

Uji penghambatan aktivitas enzim α -glukosidase dilakukan untuk mengetahui penurunan glukosa yang merupakan tanda adanya aktivitas penghambatan. Maltosa sebagai substrat dihidrolisis oleh α -glukosidase menjadi glukosa dan glukosa. Glukosa tersebut direaksikan dengan *glucose oxidase* untuk menghasilkan asam glukonat dan hydrogen peroksida (Ngwe *et al.*, 2011). Hydrogen peroksida tadi direaksikan dengan 4-aminoantipyrine, *phenol* dan *peroxidase* sebagai katalisnya untuk menghasilkan warna sehingga kadar glukosa tersebut dapat diukur dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 500 nm (Vinodu dan Padmanabhan, 2001) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas penghambatan juga dapat ditentukan dengan intensitas warna merah yang terjadi terhadap hydrogen peroksida yang bereaksi dengan 4-aminoantipyrine, *phenol* dan *peroxidase*. Semakin berkurang intensitas warna merah yang terjadi maka semakin sedikit hydrogen peroksida yang terbentuk sehingga persen inhibisi semakin tinggi.

Pada gambar 4.3 menunjukkan hasil pengujian masing-masing jenis protein terhadap enzim α -glukosidase dengan konsentrasi yang sama (25 $\mu\text{g/mL}$) yaitu protein kasar (Gg-PK) memiliki aktivitas penghambatan mencapai $24,8 \pm 2,7\%$, protein isolat (Gg-PI) mencapai $9,4 \pm 1,7\%$, dan protein terhidrolisis (Gg-PH) mencapai $51,7 \pm 4,4\%$ sedangkan akarbose sebagai kontrol positif memiliki aktivitas penghambatan mencapai $97,1 \pm 0,3\%$.



Gambar 4.3 Aktivitas Penghambatan α -Glukosidase pada Berbagai Sampel Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Analisis data menggunakan software IBM SPSS 21. Data diuji menggunakan uji *One Way* ANOVA (lampiran D). Uji *One Way* ANOVA dilakukan untuk menguji data apakah rata-rata lebih dari dua sampel berbeda secara signifikan (nyata) atau tidak. Hasil uji menunjukkan angka signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$), ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh dari pemberian sampel uji protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhadap aktivitas enzim α -glukosidase.

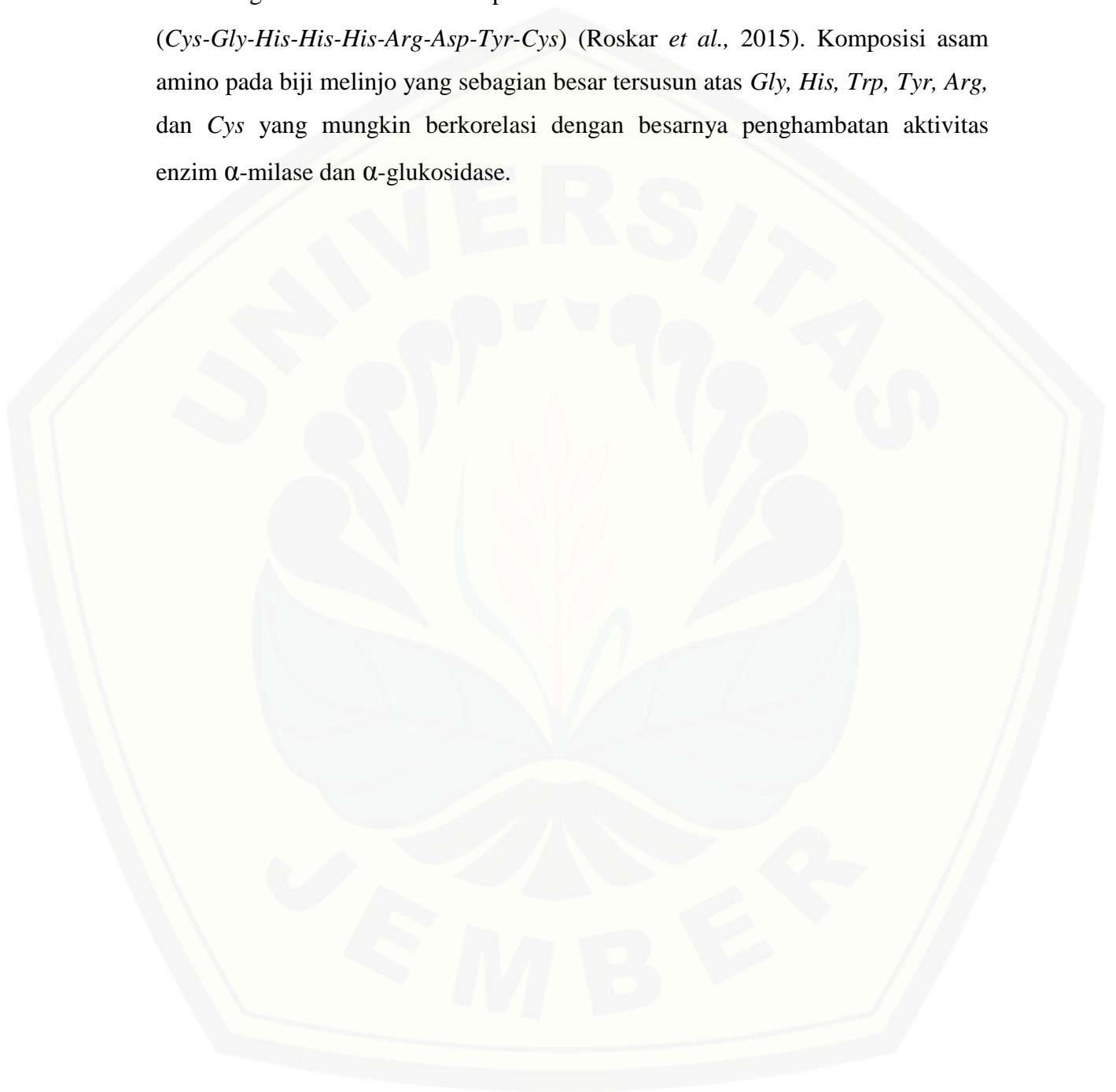
Akarbose merupakan senyawa oligosakarida yang berasal dari proses fermentasi mikroorganisme *Actinoplanes uthaenis*, dikenal dengan nama kimia O-4,6-dideoxy-4-[[[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl] amino]- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glucose dan memiliki rumus empiris $\text{C}_{25}\text{H}_{43}\text{NO}_{18}$. Senyawa oligosakarida kompleks ini merupakan inhibitor kompetitif potensial dari enzim α -amilase dan α -glukosidase untuk memecah pati, dekstrin, maltose dan sukrosa hingga menghasilkan monosakarida yang dapat dicerna. Berdasarkan sifat tersebut maka akarbose

merupakan salah satu agen antidiabetik oral bagi pasien penderita diabetes melitus tipe 2. Efek samping yang dirasakan kebanyakan pasien yang menggunakan akarbose adalah flatulensi, diare, dan sakit perut (Hollander *et al.*, 1997) .

Aktivitas penghambatan oleh sampel protein biji melinjo dengan konsentrasi (50 µg/mL) seperti pada gambar 4.2 dan konsentrasi (25 µg/mL) pada gambar 4.3 dapat disimpulkan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) mempunyai kemampuan paling tinggi dalam menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase. Presentase penghambatan Gg-PK lebih besar daripada Gg-PI dikarenakan Gg-PK masih terdapat senyawa sekunder seperti flavonoid yang larut dalam air dan turut terekstraksi (Santoso *et al.*, 2010 ; Kato *et al.*, 2011), dibandingkan dengan protein isolate yang diharapkan hanya mengandung protein (protein murni dengan konsentrasi tinggi). Banyak penelitian membuktikan bahwa senyawa fitokimia memiliki kemampuan untuk menghambat kerja enzim α -amilase dan α -glukosidase seperti senyawa dari golongan alkaloid (Patel *et al.*, 2012), triterpenes (Lai *et al.*, 2012) dan flavonoid (Wang *et al.*, 2010). Menurut Kim *et al.*, (2008) sebagian besar inhibitor α -amilase dan α -glukosidase bekerja dengan cara meniru posisi transisi unit piranosidik dari substrat glukosidase alami, sehingga diduga mekanisme penghambatan adalah berupa penghambatan kompetitif.

Kemampuan dari protein terhidrolisis yang paling efektif menghambat aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase tidak terlepas dari proses hidrolisis enzimatis yang menghasilkan bioaktif peptida. Bioaktif peptida tersusun atas asam amino rantai pendek yang aktivitasnya bergantung pada komposisi dan urutan asam amino (Jae *et al.*, 2007). Menurut penelitian sebelumnya urutan asam amino yang memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -amilase adalah GHWYYRCW (*Gly-His-Trp-Tyr-Tyr-Arg-Cys-Trp*) (Maresova *et al.*, 2005) dan RHWYYRYW (*Arg-His-Trp-Tyr-Tyr-Arg-Tyr-Trp*) (Ochiai *et al.*, 2012) di mana urutan ketiga, keempat, kelima, dan keenam residu yaitu WYYR (*Trp-Tyr-Tyr-Arg*) dalam peptida sebagai urutan penting untuk aktivitas penghambatan enzim α -amilase karena saat terjadi penghambatan secara kompetitif susunan WYYR

inilah yang berinteraksi dengan sisi aktif dari enzim α -amilase. Sedangkan urutan asam amino yang telah diketahui memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim α -glukosidase secara kompetitif di sisi aktif enzim adalah CGHHHRDYC (*Cys-Gly-His-His-His-Arg-Asp-Tyr-Cys*) (Roskar *et al.*, 2015). Komposisi asam amino pada biji melinjo yang sebagian besar tersusun atas *Gly*, *His*, *Trp*, *Tyr*, *Arg*, dan *Cys* yang mungkin berkorelasi dengan besarnya penghambatan aktivitas enzim α -amilase dan α -glukosidase.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa protein terhidrolisis (Gg-PH) biji melinjo mempunyai aktivitas penghambatan enzim α -amilase dan α -glukosidase paling tinggi diantara sampel tahapan pemurnian protein lainnya, ditunjukkan dengan presentase penghambatan α -amilase sebesar $72,09 \pm 0,58\%$ dan presentase penghambatan α -glukosidase sebesar $51,7 \pm 4,4\%$.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan uji lanjutan tentang susunan asam amino protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) agar dapat diketahui mekanisme penghambatannya dengan pasti.
2. Perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji *in vivo*, uji toksisitas, dan uji klinis agar protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dapat dimanfaatkan secara maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad Djaeni Sediaoetomo. 2000. Ilmu Gizi untuk Mahasiswa & Profesi Jilid 1. Jakarta: Dian Rakyat.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *J. Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 27 (6): 1256-1262.
- Agus Krisno Budiyanto. 2004. Gizi pada anak. In: *Dasar-dasar ilmu gizi*. 2nd ed. Ed: Universitas Muhammadiyah. UMM Press. Malang. p43-4.
- Arunsasi, ManthiriKani S, Jegadeesh G and Ravikumar M. 2010. *Submerged Fermentation Of Amylase Enzyme Byaspergillus Flavus Using Cocos Nucifera Meal*. Kathmandu University Journal Of Science, Engineering And Technology. Department of plant biology and plant biotechnologyGovt. Arts College for men's, Nandanam, Chennai. 6(2). 75-87.
- Asri, I.W.Y. 2010. *Analisis Usaha Industri Emping Melinjo Skala Rumah Tangga Di Kabupaten Magetan*. Skripsi. Surakarta: Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret. [serialonline]. <http://eprints.uns.ac.id/204/1/170492411201011352.pdf>. [15 Agustus 2014].
- Astawan M. 2009. *Hand Out Metode Evaluasi Nilai Biologis Komponen Pangan*. Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Berkelman, T., and Stenstedt, T. 1998. *2-D Electrophoresis Using Immobilized pH Gradient, Principles and Methods*. USA: Amersham Bioscience.
- Bertoldo, C. and G. Antranikian, 2002. *Starch-hydrolyzing Enzymes from Thermophilic Archaea and Bacteria*. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 151-160.
- Bösenberg LH, [van Zyl DG](#): 2008. The mechanism of action of oral antidiabetic drugs: A review of recent literature. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa (JEMDSA)*, 13 (3) / Dec, pp 80-88.
- Bradford, M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding, *Analytical of Biochemistry.*, 72, 248-254.

- Cai YZ, Luo Q, Sun M, Corkea H. 2007. Antioxidant activity and phenolic compound of 112 traditional chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci* 74: 2157-2184.
- Calder PC, Geddes R. Acarbose is a competitive inhibitor of mammalian lysosomal acid alpha-Dglucosidases. *Carbohydr Res*, [Online]. Abstract from Department of Biochemistry, University of Auckland, New Zealand. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [17 November 2014]
- Carthy, Mc Aoife L., Yvonne C. O' Challangan and Nora M. O' Brien. 2013. Protein Hydrolysates from Agricultural Crops-Bioactivity and Potential for Function Food Development. *J. Agriculture*.
- Chel-Guerrero, L., Dominguez-Magana, M., Martinez-Ayala, A., Davila-Ortiz, G., and Betancur-Ancona, D. 2012. Lima Bean (*Phaseolus lunatus*) Protein Hydrolysates with ACE-1 Inhibitory Activity. *Food and Nutrition Sciences*. Vol. 3: 511-521.
- Chisholm-Bums, M.A., Wells, B.G., Schwinghammer, T.L., Malone, P.M., Kolesar, J.M., et al. 2008. *Pharmacotherapy Principles and Practice*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.
- Corwin, E.J. 2001. *Buku Saku Patofisiologi*. Ter. Dalam Handbook of Pathophysiology oleh Brahm U. Pendit. Jakarta: EGC. 629-640.
- Corwin, Elizabeth J. 2008. *The Pancreas and Diabetes Mellitus*. Dalam *Handbook of Pathophysiology (3rd edition, hal. 550-570*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Coskun, O., Kanter, M., Kormaz, A., dan S. Oter. 2005. *Querssetin, a flavonoid antioxidant, prevent and protects streptozocin induced oxidative stress and β cell damage rat pancreas*. *Pharmacological Research*. 192: 117 – 123.
- Cummings J, Mann J. 2009. Carbohydrates. Di dalam: Mann J, Truswell AS (eds.). *Essentials of Human Nutrition*. New York: Oxford University Press, pp 35-71
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2005. *Jumlah penderita diabetes Indonesia ranking ke-4 di dunia*. Berita Dep. Kes. RI. 5 September 2005.
- Departemen Kesehatan RI. 2005. *Pharmaceutical Care untuk Penyakit Diabetes Melitus*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- DiPiro, J.T., Talbert, R.L. Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., and Posey, L.M. 2005. *Pharmacotherapy sixth edition*. New York: McGraw-Hill.

- Direktorat Gizi Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1996. *Kandungan Gizi Melinjo*, Jakarta: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Direktorat Jendral Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2005. *Pharmaceutical care* untuk penyakit diabetes melitus. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82;2002:47-95.
- Dunn, MJ. 1989. *Determination of Total Protein Concentration and Protein Purification Methods*. IRI Pers Oxford; England.
- Englard, S., and Seifter, S. 1990. *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology Volume 182*. Edited: Deutscher, M.P.. Farmington : Academic Press.
- Fatchiyah. Arumingtyas, Estri Laras. 2006. *Kromosom, Gen, DNA, Sintesis Protein dan Regulasi*. Akses tanggal 05 September 2014, 16:40. <http://inherent.brawijaya.ac.id/biomol/materi>
- Feng, J., Yang, X-V., and Wang, R-F. 2011. Bio-assay guided isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Phytochemistry.* 72: 242-247.
- Funke I and Melzig MF. 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy - phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Rev Bras Farmacogn* 16: 1-5.
- Gandjar, I. G., and Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gao H, Huang YN, Gao B, Li P, Inagaki C, Kawabata J. 2008. Inhibitory effect on α -glucosidase by *Adhatoda vasica* Nees. *Food Chem* 108: 965-972.
- Girindra, A. 2000. *Biokimia I*. Gramedia. Jakarta.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge, 1997. Free radicals and toxicology, in: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 1997, pp. 1–27.
- Hancock, R.E.W. 2000. Cationic Antimicrobial Peptides: Towards Clinical Applications. *Expert Opinion On Investigational Drugs*. Vol. 9, P. 1723-1729.

- Hoo, S. F., and Babji, A. S. 2011. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Salmon (*Salmon salar*) Skin by Alcalase. *International Food Research Journal*. Vol. 18 (4): 1359-1365.
- Info Obat Indonesia. 2009. Acarbose. <http://infodrugindonesia.blogspot.com> [15 September 2014].
- Istvan, E. 2003. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*. 4: 3-8.
- Jae, Yong Je, Zhong-ji Qian, Hee-Guk Byun, and Se-Kwon Kim. 2007. Purification and Characteristic of an Antioxidant Peptide Obtained from Tuna Backbone Protein by Enzymatic Hydrolysis. *Process Biochem*.
- Jain, V.K. 2005. *Fundamental of Plant Physiology*. New Delhi: S. Chand & Company Ltd.
- Ju, Z. Y., Hettiarachchy, N.S., and Rath, N. 2001. Extraction, Denaturation, and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Journal of Food Science*. Vol. 66 (2): 229-232.
- Kato, E., Tokunaga, Y., Sakan, F. 2009. *Stillbenoids Isolated from the Seeds of Melinjo (Gnetum gnemon L.) and Their Biological Activity*. Japan. J. Agric Food Chem, 57 (6), 2544-2549.
- Kato H, Samizo M, Kawabata R, Takano F, Ohta T. 2011. Stillbenoids dari melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Buah memodulasi sitokin produksi murine Peyer Patch sel ex vivo. *Planta Med*. 77 (10) :1027-1034.
- Kim, K.Y., Nama, K.A., Kurihara, H., Kim, S.M., 2008. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* 69, 2820–2825.
- Lai YC, Chen CK, Tsai SF, Lee SS. 2012. Triterpenes as alpha glucosidase inhibitors from *Fagus hayate*. *Phytochemistry* 74: 206-211. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.09.016.
- Lam, S. H., Chen, J. M., Kang, C. J., Chen, C. H., & Lee, S. S. (2008). Alpha glucosidase inhibitors from the seeds of *Syagrus romanzoffiana*. *Phytochemistry*, 69, 1173-1178.
- Lee SH, Park MH, Heo SJ, Kang SM, Ko SC, Han JH, Jeon YJ. 2010. Dieckol isolated from *Ecklonia cava* inhibits α -glucosidase and α -amylase in vitro and alleviates postprandial hyperglycemia in streptozotocin –induced diabetic mice. *Food Chem Toxicology* 48 : 2663-3637.

- Leveque, E., S. Janecek, B. Haye and A. Belarbi, 2000. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes-catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Enzyme Microbial Technol.*, 26: 3-14.
- Linn, W.D., Wofford, M.R., O'Keefe, M.E., & Pose, L.M. 2009. *Pharmacotherapy in primary care*. New York: McGraw-Hill.279-280;285-290.
- Mann J, and Truswell AS. 2009. *Essentials of Human Nutrition*. New York: Oxford University Press.
- Manner, H. I. and Elevitch, C.R. 2006. Gnetumgnemon (gnemon). Ver 1. 1. In: Elevitch, C.R. (ed.). *Species Profiles for Pacific Inland Agroforestry*. Hawaii: Permanent Agricultur Resources (PAR): 1-9.
- Maqueda, Ledesma, Amigo, Miralles, and Ruiz. 2013. Extraction/Fractionation Techniques for Protein and Peptides and Protein Digestion. *Food Microbiology and Food Safety* 2. DOI 10.1007/1978-1-4614-5626-1_2.
- Maresova L., Pavlik M, Horn M, and Mares M. 2005. *Chem. Biol.*, 12, 1349-1357.
- Marshall, S. H. 2003. Antimicrobial Peptides: A Natural Alternative To Chemical Antibiotics And a Potential For Applied Biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology*. 6: 271-284.
- Mayur B, Sandez S, Shrutí S, Sung-Yum S. 2010. Antioxidant and alpha-Glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. *J Med Plant Res* 4 (15) : 1547-1553.
- McCue P, Vatter D, Shetty K. 2004. Inhibitory effect of clonal oregano extracts against porcine pancreatic amylase *in vitro*. *Asia Pac J Clin Nutr* 13 (4): 401-408.
- McDougall GJ, Kulkarni NN, Stewart D. 2009. Berry polyphenol inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chem* 115: 193-199.
- Mishra, BK and Dadhich SK. 2010. *Production of Amylase and Xylanase Enzymes from Soil Fungi of Rajasthan*. *Journal Adv. Dev. Res.* 1(1). 21-23
- Muchtadi D, Palupi NS, Astawan M. 1993. *Metabolisme Zat Gizi: Sumber, Fungsi, dan Kebutuhan bagi Tubuh Manusia*. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan.
- Muhlisah, F., 2001. *Tanaman Obat Keluarga*. Edisi ke-7. Penerbit Penebar Swadaya, 7-12. Jakarta

- Murray, R.K., Granner, O.K., and Rodwell, U.W. 2009. *Biokimia Harper edisi 27 terjemahan dari Harper's Biochemistry 27th oleh Brahm U. Pendit*. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC. 53, 65, 69-72.
- Muhlisah, F., 2001. *Tanaman Obat Keluarga*. Edisi ke-7. Penerbit Penebar Swadaya, 7-12. Jakarta.
- Ngwe, H., kyin, S., & Nyo, H. H. 2011. *Chemical Analysis and α -Glucosidase Inhibitory effect of Bizat Leaves (Eupatorium odoratum L.)*. Universitas Research Journal. Vol. 4 (3): 1-11.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., and Dambmann, C. 2001. Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*. Vol. 66 (5): 642-646.
- Nuttal SL, Dunne F, Kendal MJ, Martin U, 1999. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Q J Med* 1999;92:33-8.
- Notoatmodjo, S. 2005. *Promosi Kesehatan Teori dan Aplikasinya*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. 2005. Anti-obesity effect of Nelumbo nucifera leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharm* 106: 236-244.
- Ortiz, S. E. Molina., and Wagner, J. R. 2002. Hydrolysates of Native and Modified Soy Protein Isolate: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International* (35): 511-518.
- Pace, C. N., Trevino, S., Prabhakaran, E., and Scholtz, M. 2004. Protein structure, Stability, and Solubility in Water and Other Solvents. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. Vol. 359: 1225-1235.
- Patel MB, Mishra SM. 2012. Magnoflorine from *Tinospora cordifolia* stem inhibits alpha glucosidase and is antiglycemic in rats. *J Funct Foods* 4: 79-86. DOI: 10.1016/j.jff.2011.08.002.
- PERKENI. 2011. *Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. Jakarta: Perkumpulan Endokrinologi Indonesia.
- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Rahbani-Nobar M, Adi-Beig F, Mirhashemi SM, 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Medical Journal of Islamic Academy of Sciences* 1999;12(4):109-14

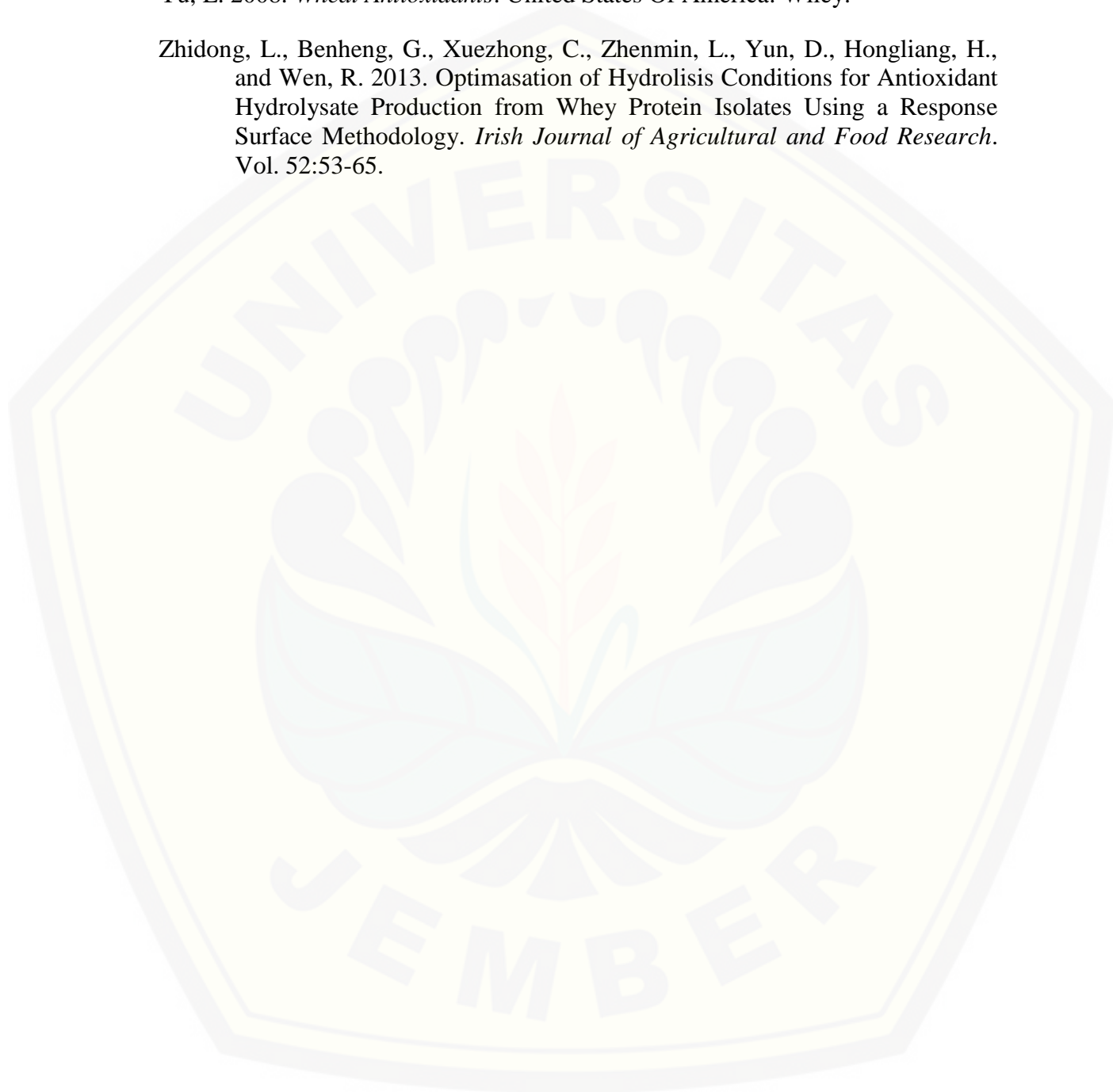
- Roskar I., Molek P., Vodnik M., Stempelj M., Strukelj B., Lunder M. 2015. Peptide Modulators of Alpha Glucosidase. Ljubljana: Journal of Diabetes Investigation.
- Salcedo-Chaves, B., Osuna-Castro, J. A., Guevara-Lara, F., Dominiquez, J., and Paredes-Lopez, O. 2002. Optimization of the Isoelectric Precipitation Method to Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *J. Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 50: 6515-6520.
- Santoso, Martha., Yuko Nata, Clement Angkawidjaja, Tomoko Yamaguchi, Teruyoshi Matoba, and Hithosi Takamura. 2010. *Antioxidant and DNA Damage Prevention Activities of the Edible Parts of Gnetum gnemon and Their Changes upon Heat Treatment*. Food Sci. Technol. Res., 16(6), 549-556.
- Shai LJ, Masako P, Mokgotho MP, Magono SR, Mogale AM, Boadou N, Ellof JN. 2010. Yeast alpha glucosidase inhibitory and antioxidant activities of six medicinal plants collected in Phalaborwo, South Africa. *South Afri J of Botany* 76: 465-470.
- Siswoyo, T.A and Aldino, M. 2007. Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content of Mlinjo Tree (*Gnetum gnemon* L.). *International Conference of Chemistry Science*, UGM, Yogyakarta.
- Siswoyo, T.A. 2011. Biji melinjo tingkatan daya tahan. *Harian Kompas*, 27 Januari 2011.
- Siswoyo, T.A., Eka M., Lee K.O. and Hosokawa K. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions From Melinjo (*Gnetum gnemon*) Seed. *J. Agricultural and Food chemistry*. 59, 5648–5656.
- Siswoyo, T. A., and Hosokawa, K. 2014. *Scavenging Hydroxyl Radical Activity and DNA Damage Protective Effect of Hydrolyzed Protein Isolate from Melinjo Seeds (Gnetum gnemon)*. Paper presented at the 4th Asian Pasific Protein Association (APPA) Confrence. Jeju, Korea.
- Siswoyo, T. A., dan Sugiharto, B. 2012. Produksi Pengembangan Protein Antihipertensi Generasi Baru Dari *Gnetum gnemon* Protein Sebagai Bahan Nutraceutical Komersial. *Prosiding InSINas*. 217-222.
- Soegondo. 2008. *Hidup Secara Mandiri dengan Diabetes Melitus Kencing Manis Sakit Gula*. Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Souza PM and Magalhães PO. *Application Of Microbial A-Amylase In Industry . A Review*. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.Submitted. 2010.

- Sudha, S. S., Karthic, R., Naveen., & Rengarmanujam, J. 2011. Anti hyperlipidemic activity of Spirulina plantesisin Triton X-100 induced hyperlipidemic rats. *Journal For Drugs and Medicines*. Vol. 3 (2): 32-37.
- Sujith, P. A., and Hymavathi, T. V., 2011. Recent Development with Debittering of Protein Hydrolysates. *As. J. Food Ag-Ind*. Vol. 4(6): 365-381.
- Suherman, S.K. 2007. Insulin dan Antidiabetik Oral. dalam S.G.Gunawan, R. Setiabadi, Nafrialdi, & Elysabeth, *Farmakologi dan Terapi* (pp.421-495). Jakarta: Departement Farmakologi & Terapeutik FK UI.
- Pahursip, A. J. N. and Sitanggang, A. B. 2011. Antimicrobial Activity of Melinjo Seed, and Solubility in Water and Other Solvents. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. Vol. 359: 1225-1235.
- Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. 2006. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J Nutrion Sci and Vitamin* 52 (2): 149:153.
- Thalapeneni NR, Chidambaram KA, Ellapan T, Sabapathi ML, Mandal SC. 2008. Inhibition of carbohydrate digestive enzymes by *Talinum portulacifolium* (Forssk) leaf extract. *J Compl Integ Med* 5 (1): 1-10.
- Tjirosoepomo, G.2004. Taksonomi Tumbuhan (spermatophyte). Cetakan ke delapan. UGM press. Hal 244.
- Vasista, P.C., 1983, Botany for Degree Students. S.Chand & Company. Anonim, Journal of Ethropharmacology, USA.
- Vinodu, M.V and Padmanabhan, M. 2001. Peroxide-like catalytic activities of ionic metallophorphyrins supported on functionalized polystyrene surface. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)*. Vol. 113 (1): 1 – 9.
- Wang H, Du YJ, Song HC. 2010. Alpha glucosidase and alpha amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chem* 123: 6-13.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. 2004. Global prevalence of diabetes estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27, 1047-1053.
- Winarno F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wolff, S. P. 1993. Diabetes mellitus and free radicals: Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complication. *British Medical Bulletin*. Vol. 49 (3): 642-432.

You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., and Lin, S., 2011. Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *Food Science and Technology*. 46: 164-168.

Yu, L. 2008. *Wheat Antioxidants*. United States Of America: Wiley.

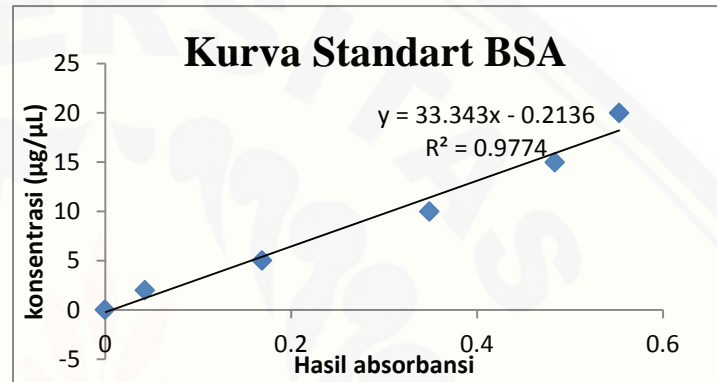
Zhidong, L., Benheng, G., Xuezhong, C., Zhenmin, L., Yun, D., Hongliang, H., and Wen, R. 2013. Optimisation of Hydrolysis Conditions for Antioxidant Hydrolysate Production from Whey Protein Isolates Using a Response Surface Methodology. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. Vol. 52:53-65.



Lampiran A. Perhitungan Kandungan Protein Biji Melinjo

A.1 Standart BSA untuk Penentuan Total Protein Terlarut

Konsentrasi BSA (µg/mL)	Hasil Absorbansi
0	0
2	0.043
5	0.169
10	0.349
15	0.484
20	0.553



A.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut

SAMPel	ABSORBANSI			KONSENTRASI (µg/µL)			RERATA KONSENTRASI	VOLUME (mL)	JUMLAH PROTEIN (mg)
	U1	U2	U3	U1	U2	U3			
Gg-PK	0.700	0.713	0.701	4.63	4.71	4.63	4.66 ± 0.05	42,5	197,9
Gg-PI	0.852	0.882	0.914	5.64	5.84	6.05	5.84 ± 0.21	12,5	73
Gg-PH	0.437	0.439	0.439	2.87	2.88	2.88	2.88 ± 0,01	6,4	18,4

Lampiran B. Penghambatan Aktivitas Enzim Alfa Amilase dan Alfa Glukosidase

B.1 Perhitungan aktivitas penghambatan Alfa Amilase

SAMPEL	S+			S-			S(+) - S (-)			Penghambatan (%)	rerata (%)	STDEV		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3					
Gg-PK	0.530	0.535	0.538	0.432	0.438	0.446	0.098	0.097	0.092	43.023	43.605	46.512	44.38	1.87
Gg-PI	0.595	0.597	0.598	0.458	0.456	0.455	0.137	0.141	0.143	20.349	18.023	16.860	18.41	1.78
Gg-PH	0.524	0.519	0.526	0.477	0.471	0.477	0.047	0.048	0.049	72.674	72.093	71.512	72.09	0.58
Akarbose	0.067	0.065	0.062	0.062	0.059	0.059	0.005	0.006	0.003	97.093	96.512	98.256	97.29	0.89
K+	0.449													
K-	0.277													
	0.172													

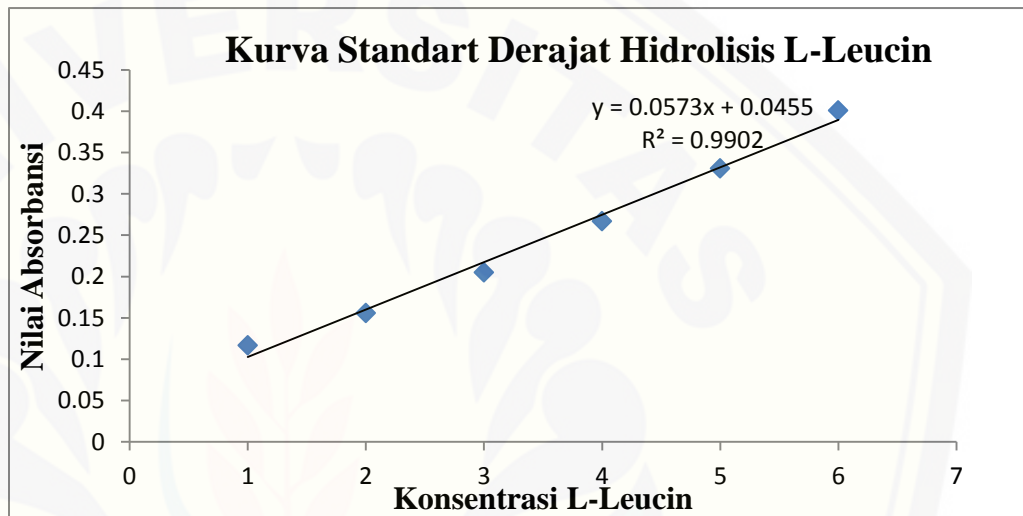
B.2 Perhitungan aktivitas penghambatan Alfa Glukosidase

SAMPEL	S+			S-			S(+) - S (-)			Penghambatan (%)	rerata (%)	STDEV		
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3					
Gg-PK	0.785	0.794	0.784	0.384	0.389	0.405	0.401	0.405	0.379	23.6	22.9	27.8	24.8	2.7
Gg-PI	0.799	0.807	0.8	0.33	0.335	0.314	0.469	0.472	0.486	10.7	10.1	7.4	9.4	1.7
Gg-PH	0.77	0.76	0.717	0.5	0.497	0.49	0.27	0.263	0.227	48.6	49.9	56.8	51.7	4.4
Akarbose	0.051	0.051	0.051	0.037	0.036	0.034	0.014	0.02	0.017	97.3	97.1	96.8	97.1	0.3
B	0.746	0.746	0.746	0.213	0.22	0.229	0.533	0.526	0.517					

Lampiran C. Perhitungan Derajat Hidrolisis

C.1 Standart derajat hidrolisis dengan L-Leucin

konsentrasi L-Leucin (μL)	absorbansi
0	0
1	0.117
2	0.156
3	0.205
4	0.267
5	0.331
6	0.401



C.2 Hidrolisis asam Gg-PI

Tujuan : memotong seluruh ikatan peptida

Prinsip : sampel + HCl → konsentrasinya 6 N HCl

Langkah : 12,08 N HCl diencerkan menjadi 6 N HCl

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$12,08 \text{ N} \times V1 = 6 \text{ N} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V1 = 248,3 \mu\text{L}$$

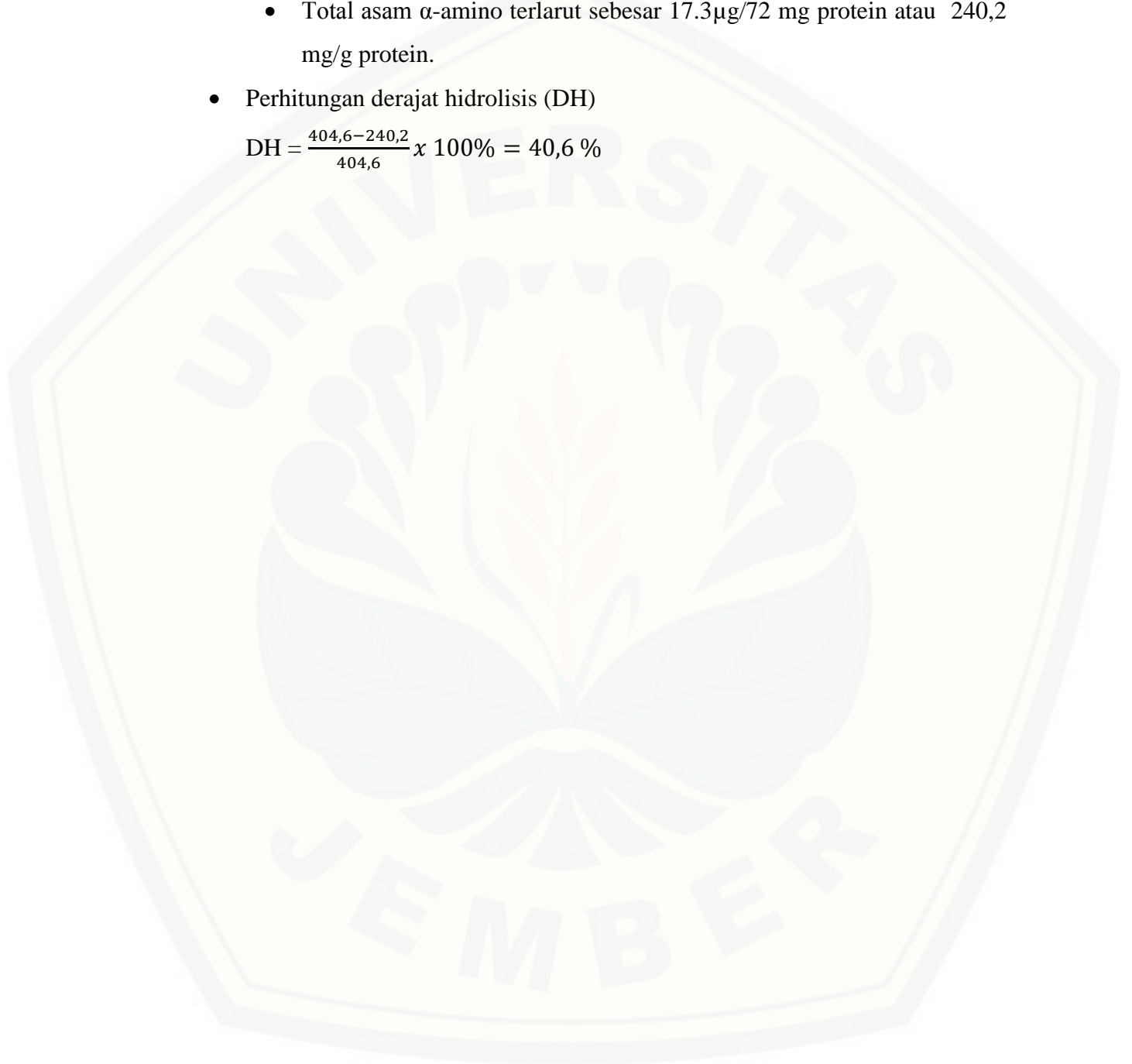
Jadi 12,08 N HCl diambil sebanyak 248,3 μL dan ditambahkan sampel Gg-PI sebanyak 251,7 μL , kemudian diinkubasi 110⁰C selama 12 jam. Hasil hidrolisis Gg-PI secara asam disebut sebagai Gg-PI_(asam).

D.3 Perhitungan derajat hidrolisis

- Konsentrasi Gg-PI = 5,84 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- Total asam α -amino Gg-PI yang dihidrolisis secara asam (Gg-PI_(asam))
 - 248,3 μL Gg-PI + 251,7 μL 12,08 N HCl = 500 μL Gg-PI_(asam) dengan jumlah protein yang dimasukkan 1,45 mg.
 - Gg-PI_(asam) yang diencerkan 7x untuk pengukuran α -amino menggunakan metode TNBS (10 μL Gg-PI_(asam) dalam 60 μL aquadest) = Gg-PI_{asam 7x}
 - Absorbansi 25 μL Gg-PI_{asam 7x} pada λ 420 (TNBS) = 0.512 sehingga jumlah asam α -amino dalam 25 μL Gg-PI_{asam 7x} = 8,44 μg
 - Total asam α -amino terlarut sebesar 59.08 $\mu\text{g}/146$ mg protein atau 404,6 mg/g protein.
- Total asam α -amino terlarut Gg-PH
 - Gg-PH diencerkan 2x untuk pengukuran α -amino menggunakan metode TNBS (10 μL Gg-PH_{2x} pada λ 420 (TNBS)= Gg-PH_{2x}

- Absorbansi 25 μL Gg-PH_{asam2x} pada λ 420 (TNBS) = 0.524 sehingga jumlah asam α -amino dalam 25 μL Gg-PH_{asam2x} = 8,65 μg
- Total asam α -amino terlarut sebesar 17.3 μg /72 mg protein atau 240,2 mg/g protein.
- Perhitungan derajat hidrolisis (DH)

$$\text{DH} = \frac{404,6 - 240,2}{404,6} \times 100\% = 40,6 \%$$



Lampiran D. Pengujian Statistik Data Penelitian

D.1 Uji Normalitas Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Aktivitas enzim	Alpha glukosidase
N		12	12
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	58,0426	56,2222
	Std. Deviation	30,8960	37,5017
Most Extreme Differences	Absolute	,169	,271
	Positive	,146	,241
	Negative	-,169	-,271
Kolmogorov-Smirnov Z		,584	,937
Asymp. Sig. (2-tailed)		,885	,343

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

D.2 Uji Homogenitas Levene-Statistik

Enzim Alfa Amilase

Test of Homogeneity of Variances

Aktivitas enzim

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,150	3	8	,172

Enzim Alfa Glukosidase

Test of Homogeneity of Variances

Alpha glukosidase

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,585	3	8	,126

D.3 Uji *One Way* ANOVA*One Way* Anova Parameter Enzim Alfa Amilase

Descriptives

Aktivitas enzim

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Gg-PK	3	44,380	1,869	1,079	39,737	49,023	43,02	46,51
Gg-PI	3	18,411	1,776	1,025	13,999	22,823	16,86	20,35
Gg-PH	3	72,093	,581	,336	70,649	73,537	71,51	72,67
Akarbose	3	97,287	,888	,513	95,081	99,493	96,51	98,26
Total	12	58,043	30,896	8,919	38,412	77,673	16,86	98,26

ANOVA

Aktivitas enzim

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10484,609	3	3494,870	1798,126	,000
Within Groups	15,549	8	1,944		
Total	10500,158	11			

Uji LSD Parameter Enzim Alfa Amilase

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Aktivitas enzim

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Gg-PK	Gg-PI	25,9690*	1,1383	,000	23,3440	28,5939
	Gg-PH	-27,7132*	1,1383	,000	-30,3381	-25,0882
	Akarbose	-52,9070*	1,1383	,000	-55,5319	-50,2820
Gg-PI	Gg-PK	-25,9690*	1,1383	,000	-28,5939	-23,3440
	Gg-PH	-53,6822*	1,1383	,000	-56,3071	-51,0572
	Akarbose	-78,8760*	1,1383	,000	-81,5009	-76,2510
Gg-PH	Gg-PK	27,7132*	1,1383	,000	25,0882	30,3381
	Gg-PI	53,6822*	1,1383	,000	51,0572	56,3071
	Akarbose	-25,1938*	1,1383	,000	-27,8187	-22,5689
Akarbose	Gg-PK	52,9070*	1,1383	,000	50,2820	55,5319
	Gg-PI	78,8760*	1,1383	,000	76,2510	81,5009
	Gg-PH	25,1938*	1,1383	,000	22,5689	27,8187

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

One Way Anova Parameter Alfa Glukosidase

Descriptives

Alpha glukosidase

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Gg-PK	3	29,587	2,166	1,251	24,206	34,968	27,81	32,00
Gg-PI	3	12,571	1,693	,977	8,366	16,777	11,24	14,48
Gg-PH	3	85,651	1,480	,854	81,975	89,326	84,00	86,86
Akarbose	3	97,079	,291	,168	96,357	97,802	96,76	97,33
Total	12	56,222	37,502	10,826	32,395	80,050	11,24	97,33

ANOVA

Alpha glukosidase

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15450,473	3	5150,158	2095,221	,000
Within Groups	19,664	8	2,458		
Total	15470,138	11			

Uji LSD Parameter Alfa Glukosidase

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Alpha glukosidase

LSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Gg-PK	Gg-PI	17,0159*	1,2801	,000	14,0639	19,9678
	Gg-PH	-56,0635*	1,2801	,000	-59,0154	-53,1115
	Akarbose	-67,4921*	1,2801	,000	-70,4440	-64,5401
Gg-PI	Gg-PK	-17,0159*	1,2801	,000	-19,9678	-14,0639
	Gg-PH	-73,0794*	1,2801	,000	-76,0313	-70,1274
	Akarbose	-84,5079*	1,2801	,000	-87,4599	-81,5560
Gg-PH	Gg-PK	56,0635*	1,2801	,000	53,1115	59,0154
	Gg-PI	73,0794*	1,2801	,000	70,1274	76,0313
	Akarbose	-11,4286*	1,2801	,000	-14,3805	-8,4766
Akarbose	Gg-PK	67,4921*	1,2801	,000	64,5401	70,4440
	Gg-PI	84,5079*	1,2801	,000	81,5560	87,4599
	Gg-PH	11,4286*	1,2801	,000	8,4766	14,3805

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



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

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

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 451 /H25.1.11/KE/2014

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

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

UJI EFEKTIVITAS PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*) SEBAGAI INHIBITOR AKTIVITAS ALFA-AMILASE DAN ALFA-GLUKOSIDASE SECARA IN VITRO

Nama Peneliti Utama : Robitha Kartika Sari (NIM. 112010101081)
Name of the principal investigator

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

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



2014

Tanggapan Anggota Komisi Etik

(Diisi oleh Anggota Komisi Etik, berisi tanggapan sesuai dengan butir-butir isian diatas dan telaah terhadap Protokol maupun dokumen kelengkapan lainnya)

• Pendidikan dpt dilanjutkan



2014

Novi Rizki Ryanti, Sp.PK