



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN HIDROLISAT BIJI MELINJO
(*Gnetum gnemon L.*) SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

Oleh

**Andhy Isra' Biby Rachmawati
NIM 092210101081**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN HIDROLISAT BIJI MELINJO
(*Gnetum gnemon L.*) SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI**

SKRIPSI

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

Oleh

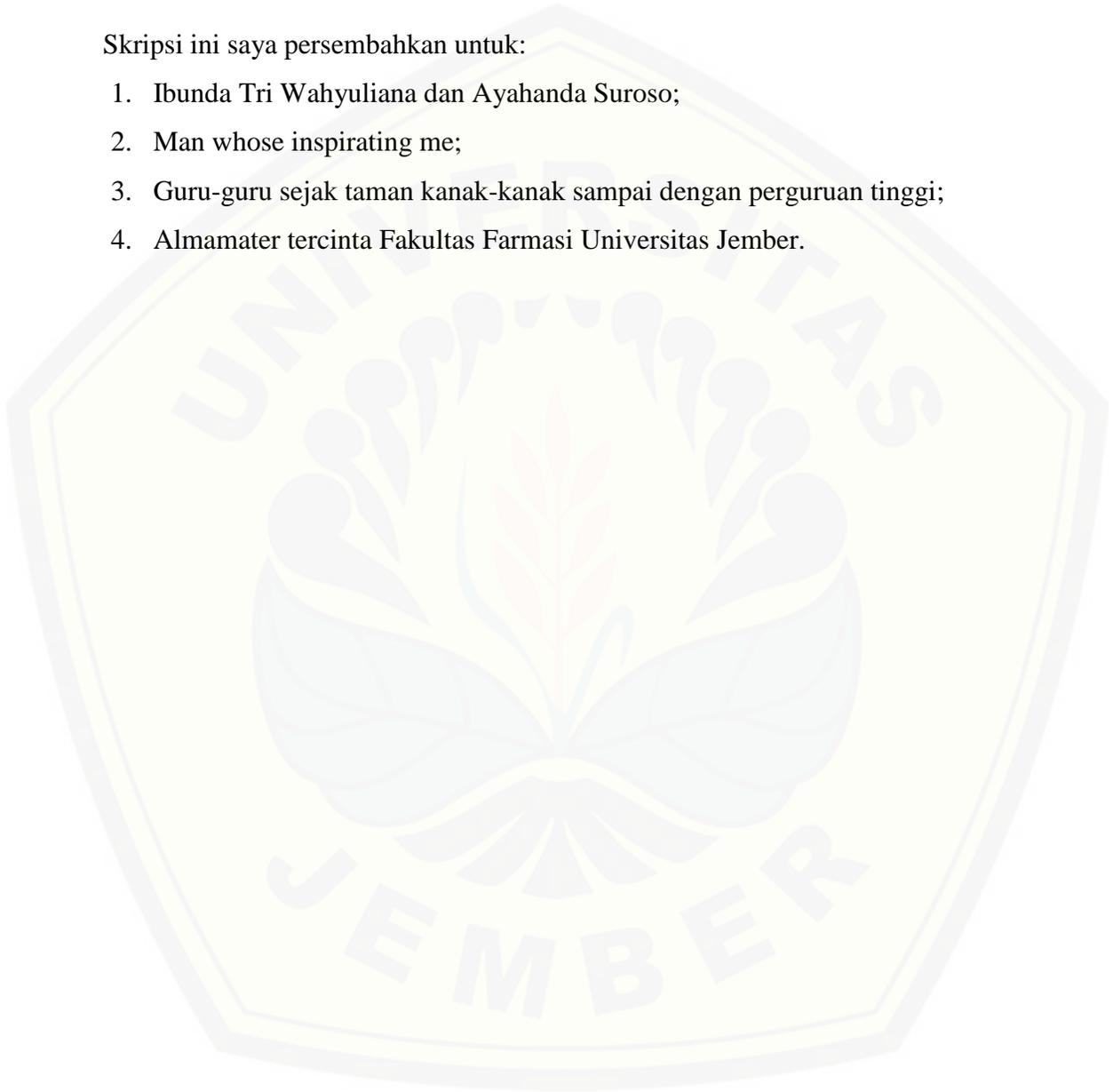
Andhy Isra' Biby Rachmawati
NIM 092210101081

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Tri Wahyuliana dan Ayahanda Suroso;
2. Man whose inspiring me;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember.



MOTTO

Dan Kami pasti akan menguji kamu dengan sedikit ketakutan, kelaparan, kekurangan harta, jiwa, dan buah-buahan. Dan sampaikanlah berita gembira kepada orang-orang yang sabar. Yaitu orang-orang yang apabila ditimpa musibah, mereka berkata “Innalillahi wa inna ilaihi raji’un (sesungguhnya kami milik Allah dan kepada-Nya kami kembali). Mereka itulah yang memperoleh ampunan dan rahmat dari Tuhan-nya, dan mereka itulah orang-orang yang mendapat petunjuk.

(terjemahan Surat Al-Baqarah: 155-157 *)

*) Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. *Al Qur'an dan Terjemahnya*. Bandung: CV Penerbit Diponegoro.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andhy Isra' Biby Rachmawati

NIM : 092210101081

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "*Uji Efektivitas Protein Hidrolisat Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) sebagai Agen Antibakteri*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan prinsip ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 15 April 2015

Yang menyatakan,

Andhy Isra' Biby Rachmawati

NIM 092210101081

SKRIPSI

**UJI EFEKTIVITAS PROTEIN HIDROLISAT BIJI MELINJO
(*Gnetum gnemon L.*) SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI**

Oleh

Andhy Isra' Biby Rachmawati
NIM 092210101081

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Evi Umayah Ulfa, S.Si., M. Si., Apt.

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

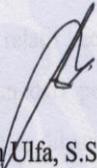
PENGESAHAN

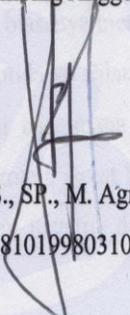
Skripsi berjudul “Uji Efektivitas Protein Hidrolisat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) sebagai Agen Antibakteri” telah diuji dan disahkan pada oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

hari : Rabu
tanggal : 15 April 2015
tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

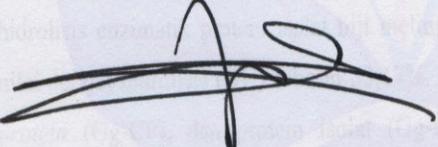
Dosen Pembimbing Anggota,

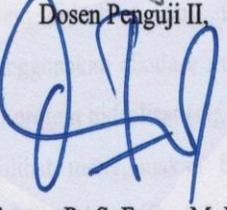

Evi Umayah Ulfa, S.Si., M. Si., Apt.
NIP 197807282005012001

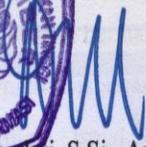

Prof. Tri Agus S., SP., M. Agr., Ph.D.
NIP 197008101998031001

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,


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


Dian Agung P., S. Farm., M. Farm., Apt.
NIP 198410082008121004

Mengesahkan
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Uji Efektivitas Protein Hidrolisat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai Agen Antibakteri; Andhy Isra' Biby Rachmawati, 092210101081; 2015; 65 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Eksplorasi agen antibakteri alami semakin meningkat, sejalan dengan meningkatnya permintaan konsumen terhadap produk obat yang bebas dari bahan sintetik kimia. Kandungan protein yang tinggi (9-10%) pada biji melinjo (*Gnetum gnemon*) sangat berpotensi sebagai sumber protein fungsional alami. Modifikasi protein secara hidrolisis enzimatis merupakan salah satu teknik untuk menurunkan berat molekul protein. Karakteristik peptida antibakteri alami biasanya memiliki berat molekul yang relatif kecil untuk mempermudah penetrasi peptida ke dalam membran bakteri. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui bagaimana efektivitas protein hidrolisat dibandingkan dengan *crude protein* dan protein isolat biji melinjo dalam menghambat aktivitas bakteri *Escherichia coli* (Gram negatif) dan *Bacillus subtilis* (Gram positif).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa protein hidrolisat yang didapat dari hidrolisis enzimatis protein isolat biji melinjo menggunakan alkalase menunjukkan nilai derajat hidrolisis (DH) sebesar 53,17%. Profil protein hidrolisat (Gg-PH), *crude protein* (Gg-CP), dan protein isolat (Gg-PI) dilihat menggunakan SDS-PAGE. Berdasarkan hasil analisis profil protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) dan derajat hidrolisis tersebut, memperlihatkan bahwa protein isolat biji melinjo (Gg-PI) berhasil dihidrolisis secara enzimatis menggunakan enzim alkalase.

Uji efektivitas antibakteri menggunakan metode *dilution test* menunjukkan bahwa nilai IC_{50} Gg-PH paling kecil dibandingkan dengan Gg-Cp dan Gg-PI pada kedua bakteri uji, serta terdapat perbedaan bermakna dengan Gg-CP dan Gg-PI. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh hidrolisis secara enzimatis menggunakan alkalase terhadap aktivitas antibakteri protein isolat biji melinjo berupa peningkatan efektivitas Gg-PH dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*

dibandingkan Gg-CP dan Gg-PI. Dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa modifikasi protein secara hidrolisis enzimatik menggunakan alkalase untuk menurunkan berat molekul protein isolat biji melinjo mampu meningkatkan efektivitas protein hidrolisat (Gg-PH) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *B. subtilis*.



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah Swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Uji Efektivitas Protein Hidrolisat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai Agen Antibakteri". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

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

1. Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm, selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember.
2. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si., Apt., selaku Dosen Pembimbing Utama, Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik, Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt., dan Dian Agung P., S. Farm., M. Farm., Apt. selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing saya.
3. Ibunda Tri Wahyuliana dan Ayahanda Suroso yang telah mendidik, menyayangi, dan mendoakan saya. Adik saya, Andy Wahyu Priadana dan seluruh keluarga besar yang turut mendoakan serta memberikan semangat;
4. Prof. Bambang Sugiharto, Dr. Tri Handoyo, Dr. Hardian, dan seluruh staf CDAST yang memberikan motivasi demi terselesaikannya skripsi ini.
5. Teman-teman sejawat, kampus, organisasi, kos Kalimantan IV serta kos Mastrib 23A yang telah memberikan dorongan dan semangat;
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu;

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

Jember, 15 April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

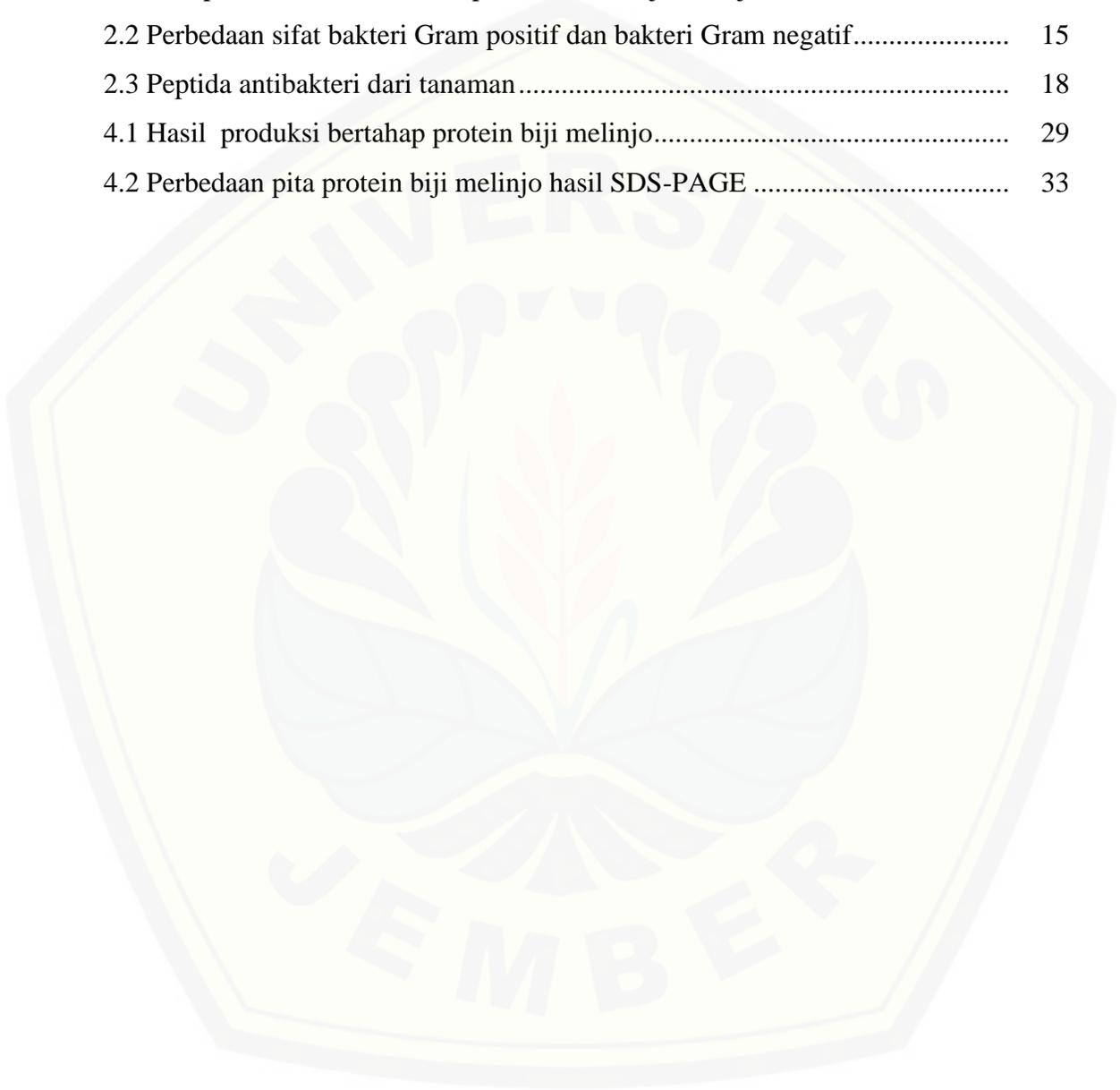
	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Deskripsi Biji Melinjo	5
2.2 Protein	6
2.2.1 Sifat Fisika Kimia.....	6
2.2.2 Klasifikasi Protein.....	7
2.3 Isolasi Protein	9
2.3.1 Ekstraksi.....	9

2.3.2 Presipitasi	9
2.4 Hidrolisis Protein	10
2.4.1 Parameter Hidrolisis	10
2.4.2 Alkalase	11
2.5 Analisis Kuantitatif Protein	12
2.6 SDS-PAGE.....	12
2.7 Bakteri	13
2.7.1 Karakteristik	13
2.7.2 <i>Escherichia coli</i>	15
2.7.3 <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.8 Peptida Antibakteri.....	17
2.8.1 Karakteristik.....	17
2.8.2 Mekanisme Kerja	18
2.9 Ampisilin	19
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Jenis Penelitian	20
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	20
3.3 Sampel Penelitian	20
3.4 Alat dan Bahan Penelitian.....	20
3.5 Rancangan Penelitian	21
3.6 Variabel Penelitian	22
3.6.1 Variabel Bebas	22
3.6.2 Variabel Terikat.....	22
3.6.3 Variabel Terkendali	23
3.7 Definisi Operasional	23
3.8 Prosedur Penelitian.....	23
3.8.1 Ekstraksi dan Isolasi Protein Biji Melinjo.....	23
3.8.2 Hidrolisis Enzimatik Protein Isolat	24
3.8.3 Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut	24

3.8.4 Pengukuran Derajat Hidrolisis	24
3.8.5 Elektroforesis SDS-PAGE.....	25
3.8.6 Uji Aktivitas Antibakteri Protein Biji Melinjo.....	26
3.9 Analisis Data	27
3.9 Skema Kerja Penelitian	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Ekstraksi Gg-CP dan Isolasi Gg-PI Biji Melinjo	29
4.2 Hidrolisis Enzimatik Gg-PH Biji Melinjo	30
4.3 Profil Protein Biji Melinjo	32
4.4 Efektivitas Gg-PH Biji Melinjo sebagai Agen Antibakteri	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo	6
2.2 Perbedaan sifat bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif.....	15
2.3 Peptida antibakteri dari tanaman.....	18
4.1 Hasil produksi bertahap protein biji melinjo.....	29
4.2 Perbedaan pita protein biji melinjo hasil SDS-PAGE	33



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi biji melinjo.....	5
2.2 Pembentukan ikatan peptida diantara dua asam amino.....	7
2.3 Reaksi reagen TNBS dengan asam amino	11
2.4 Pemasangan gel elektroforesis poliakrilamida.....	13
2.5 Diagram skematik dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif	14
2.6 Kurva pertumbuhan <i>E. coli</i>	16
2.7 Kurva pertumbuhan <i>B. subtilis</i>	17
2.8 Model mekanisme kerja peptida antibakteri	19
4.1 Hasil SDS-PAGE protein biji melinjo	32
4.2 Zona hambatan sampel uji terhadap bakteri (A) <i>E. coli</i> dan (B) <i>B. subtilis</i>	35
4.3 Grafik batang nilai IC_{50} sampel uji terhadap <i>E. coli</i>	36
4.4 Grafik batang nilai IC_{50} sampel uji terhadap <i>B. subtilis</i>	37
4.5 Diagram skematis perbedaan kecepatan peptida antibakteri bermuatan positif dalam menembus dinding sel bakteri (A) Gram positif dan (B) Gram negatif.....	40

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi bahan yang digunakan dalam penelitian	50
B. Pengukuran konsentrasi protein terlarut	53
C. Perhitungan derajat hidrolisis (DH)	54
D. Pengukuran berat molekul protein.....	57
E. Uji aktivitas antibakteri protein biji melinjo menggunakan <i>dilution test</i>	59
F. Analisis data statistik	61
G. Dokumentasi penelitian	65

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Eksplorasi agen antibakteri alami semakin meningkat, sejalan dengan meningkatnya permintaan konsumen terhadap produk obat yang bebas dari bahan sintetik kimia, menurut *World Health Organization* (WHO), lebih dari 80% populasi dunia mempercayai pengobatan tradisional sebagai kebutuhan utama dalam menjaga pertahanan tubuh dari infeksi (Parthasarathy *et al.*, 2009). Hal ini memicu para peneliti untuk mengeksplorasi tanaman lokal yang berpotensi sebagai obat untuk melindungi tubuh manusia dari infeksi mikroba. Penggunaan antibiotik sintetik juga memiliki efek negatif bagi tubuh seperti meningkatkan toksisitas karena tidak mudah terdegradasi di dalam tubuh dan dapat membunuh flora normal tubuh sehingga dibutuhkan alternatif agen antibakteri yang efektif membunuh bakteri namun aman bagi tubuh (Kang *et al.*, 2012). Oleh karena itu, pencarian senyawa alami yang berpotensi sebagai agen antibakteri penting dilakukan karena dinilai aman bagi tubuh dan dapat dikembangkan lebih lanjut untuk mengatasi masalah *multidrug-resistant* antibiotik.

Protein adalah salah satu produk esensial yang dibutuhkan oleh semua makhluk hidup dan mudah diserap oleh tubuh dalam bentuk peptida dan asam amino. Beberapa peptida memiliki aktivitas fungsional seperti antibakteri, agen kemoterapi (Tanaka, 2001), antiviral (Chinchar *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2001; Chernysh *et al.*, 2002), serta pencegah infeksi (Vizioli and Salzet, 2003) (Marshall and Arenas, 2003). Penggunaan senyawa alami protein sebagai sumber obat yang memiliki aktivitas fungsional menghambat pertumbuhan bakteri merupakan salah satu alternatif untuk mendapatkan antibakteri alami. Selama kurun waktu dua dekade ini, telah banyak dikaji protein dari tumbuhan yang memiliki peran penting dalam sistem pertahanan tubuh melawan infeksi mikroba atau biasa disebut peptida antibakteri misalnya Pg-AMP1, Ocatin, Vicilin, dan Potamin 1 (Candido *et al.*, 2011). Perkembangan ilmu dan teknologi juga memungkinkan aplikasi bidang bioteknologi untuk meningkatkan produksi dan aktivitas peptida antibakteri melalui rekayasa genetik (Marshall and Arenas, 2003)

sehingga sangat berpotensi untuk dikembangkan dalam bidang farmasi dan dipasarkan secara komersial (Kang *et al.*, 2012).

Karakteristik antibakteri alami berbasis protein biasanya memiliki polipeptida yang pendek dengan berat molekul yang relatif kecil seperti Ocatin dengan berat molekul 18 KDa (153 asam amino) (Candido *et al.*, 2011) dan Pg-AMP 1 dengan berat molekul 6 KDa (55 asam amino) (Pelegriani *et al.*, 2011). Protein dengan berat molekul yang relatif kecil tersebut memudahkan penetrasi protein ke dalam membran bakteri (Jenssen *et al.*, 2006). Hidrolisis secara enzimatis merupakan salah satu metode yang digunakan untuk menurunkan berat molekul protein tanpa menyebabkan kerusakan asam amino (Celus *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 2013). Hidrolisis enzimatis umumnya 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). Produk hasil hidrolisis tersebut biasanya disebut protein hidrolisat. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein hidrolisat mampu meningkatkan efektivitas protein seperti protein antihipertensi tanaman chia (*Salvia hispanica* L.) (Segura-Campos *et al.*, 2013), efektivitas protein antihipertensi biji *Phaseolus lunatus* (Chel-Guerrero *et al.*, 2012), efektivitas protein antioksidan dan antihipertensi biji pumpkin (*Cucurbita pepo*) (Vastag *et al.*, 2011), serta efektivitas protein antibakteri *Actinopyga lecanora* (Ghanbari *et al.*, 2012).

Ekstraksi dan isolasi protein merupakan proses pertama untuk mendapatkan material awal yang akan diproduksi menjadi protein hidrolisat. Ekstraksi protein menggunakan pelarut air merupakan metode yang paling sederhana, karena sebagian besar protein larut di dalam air (Cowan, 1999). Isolasi *crude* protein hasil ekstraksi bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi protein. Isolasi isoelektrik merupakan metode yang banyak digunakan untuk mendapatkan protein isolat sebagai material awal hidrolisis enzimatis, seperti penelitian Segura-Campos *et al.* (2013), Chel-Guerrero *et al.* (2012), Siswoyo dan Sugiharto (2012).

Prinsip metode isolasi isoelektrik yaitu presipitasi protein pada pH asam (pH 4-6) dan melarutkan protein pada pH basa (pH 8-9) (Salcedo-Chavez *et al.*, 2002).

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan famili *Gnetaceae* yang banyak dibudidayakan di Indonesia seperti Sumatera dan Jawa (Manner and Elevitch, 2006). Biji melinjo diproduksi sebagai penghasil tepung (Siswoyo dan Sugiharto, 2012) dan diolah sebagai kue, keripik emping oleh masyarakat lokal. Komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein, dan 1% fenolik (Siswoyo dan Sugiharto, 2012). Kandungan protein biji melinjo yang relatif besar sangat berpotensi sebagai sumber protein fungsional alami (Siswoyo dan Sugiharto, 2012). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa protein biji melinjo mempunyai aktivitas sebagai antioksidan (Siswoyo *et al.*, 2011), antihipertensi (Siswoyo dan Sugiharto, 2012), serta aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, dan *Salmonella thypi*. (Haryono, 2005). Potensi protein biji melinjo sebagai agen antibakteri juga dijelaskan oleh Bhat dan Yahya (2014), adanya asam amino sistein yang relatif besar sekitar 8,28% mempengaruhi fleksibilitas protein dalam menembus membran bakteri. Menurut Siswoyo dan Hosogawa (2014), protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase memiliki jumlah asam amino terhidrolisis paling tinggi dibandingkan enzim tripsin dan pepsin yang ditandai dari derajat hidrolisisnya. Dari hasil tersebut, modifikasi protein secara enzimatis menggunakan enzim alkalase yang disebut sebagai protein hidrolisat diharapkan mampu meningkatkan efektivitas protein fungsional biji melinjo sebagai agen antibakteri. Bakteri uji yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antibakteri protein biji melinjo terhadap Gram negatif dan Gram positif yang diwakili oleh *E. coli* dan *B. subtilis*. *E. coli* adalah bakteri Gram negatif flora normal saluran pencernaan, pada strain yang bersifat patogen dapat menyebabkan gastroenteritis akut, abses apendikular, peritonitis (Sonibare and Abegunde, 2012), dan diare akut (Public Health Agency of Canada, 2011). *B. subtilis* adalah bakteri Gram positif yang sering menyebabkan keracunan makanan (Sonibare and Abegunde, 2012).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini yaitu

- a) Bagaimana profil protein hidrolisat biji melinjo menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*) ?
- b) Bagaimana efektivitas protein hidrolisat dibandingkan dengan *crude* protein dan protein isolat biji melinjo dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu

- a) Untuk mengetahui profil protein hidrolisat biji melinjo menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrilamide Gel Electrophoresis*).
- b) Untuk mengetahui efektivitas protein hidrolisat dibandingkan dengan *crude* protein dan protein isolat biji melinjo dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*.

1.4 Manfaat

Penelitian ini dapat dijadikan dasar penelitian selanjutnya dalam mengembangkan peptida antibakteri sebagai alternatif sumber antibakteri alami dari produk biji melinjo.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Biji Melinjo

Berikut klasifikasi tanaman *Gnetum gnemon* L. menurut National Plant Data Center NRCS USDA (2000):

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Viridaeplantae
Divisi : Tracheophyta
Kelas : Gnetopsida
Ordo : Gnetales
Famili : *Gnetaceae*
Genus : *Gnetum*
Spesies : *Gnetum gnemon* L.

Melinjo tersebar di Indonesia seperti Andaman, Sumatera, dan Jawa. Morfologi biji melinjo berbentuk ovoid dengan panjang 1-3,5 cm, berwarna kuning atau orange kemerahan ketika sudah masak dan kulitnya tipis. Musim panen melinjo di Indonesia ada tiga kali dalam setahun yaitu Maret-April, Juni-Juli, dan September-Oktober (Manner and Elevitch, 2006). Komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo dan Sugiharto, 2012). Kandungan metabolit sekunder biji melinjo berupa saponin, tanin, dan flavonoid (Santoso *et al.*, 2010; Kato *et al.*, 2011; Parhusip and Sitanggang, 2011). Morfologi biji melinjo ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi biji melinjo (Kato *et al.*, 2009)

Hasil isolasi protein biji melinjo yang dilakukan oleh Bhat dan Yahya (2014) didapatkan bahwa persentase asam amino bermuatan positif, negatif, hidrofilik, dan hidrofobik berturut-turut yaitu 9,08 %, 18,67 %, 21,56 %, dan 27,56 %. Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo

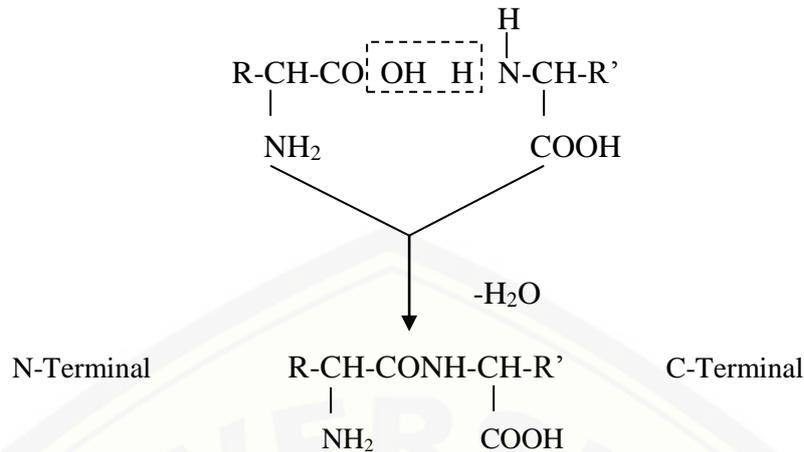
Asam amino	n	g/100 g protein
Histidin	3	1,20 ± 0,2
Treonin	3	3,32 ± 0,5
Valin	3	4,32 ± 0,4
Sistein	3	8,28 ± 5,9
Metionin	3	0,58 ± 0,3
Lisin	3	4,53 ± 0,6
Isoleusin	3	2,86 ± 0,3
Leusin	3	4,89 ± 0,5
Fenilalanin	3	2,69 ± 0,5
Asam aspartat	3	7,07 ± 0,4
Serin	3	5,41 ± 0,9
Asam glutamat	3	11,6 ± 0,3
Glisin	3	4,55 ± 1,5
Arginin	3	3,35 ± 0,9
Alanin	3	6,59 ± 0,4
Prolin	3	5,69 ± 0,2
Tirosin	3	2,48 ± 0,6

Sumber: Bhat dan Yahya (2014)

2.2 Protein

2.2.1 Sifat Fisika Kimia

Protein merupakan polipeptida berbobot molekul tinggi yang tersusun atas beberapa asam amino yang bergabung membentuk ikatan peptida (-CONH-). Peptida merupakan monomer dari protein yang terdiri (kurang atau sama dengan 100) asam amino (Hu, 2014). Semua asam amino (kecuali prolin) mempunyai struktur dasar yang sama, yaitu terdiri dari gugus karboksilat (-COOH), gugus amino (-NH₂), dan gugus R sebagai gugus fungsional (*side chain*) yang menentukan sifat kimiawi protein (Fatchiyah *et al.*, 2011). Pembentukan ikatan peptida di antara dua asam amino dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Pembentukan ikatan peptida diantara dua asam amino (Jain, 2005)

Selain ikatan peptida, 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 ionik) (Fatchiyah *et al.*, 2011).

2.2.2 Klasifikasi Protein

Semua jenis protein terdiri dari rangkaian dan kombinasi dari 20 asam amino. Setiap jenis protein mempunyai jumlah dan urutan asam amino yang khas. Menurut Fatchiyah *et al.* (2011), berdasarkan gugus R (gugus fungsional) yang menentukan sifat kimiawi protein, asam amino dibedakan menjadi empat yaitu

- a. Asam amino yang mempunyai gugus R nonpolar atau hidrofobik, yaitu

Alanin	Valin	Leusin	Prolin
Isoleusin	Metionin	Triptofan	Fenilalanin
- b. Asam amino yang mempunyai gugus R bermuatan negatif pada pH 6-7, yaitu

Asam aspartat	Asam glutamat
---------------	---------------
- c. Asam amino yang mempunyai gugus R hidrofilik, yaitu

Asparagin	Glutamin	Glisin	Serin
Treonin	Tirosin	Sistein	

- d. Asam amino yang mempunyai gugus R bermuatan positif pada pH 6-7, yaitu

Lisin Arginin Histidin

Menurut Jain (2005), berdasarkan produk hasil hidrolisis oleh asam atau enzim proteolitik, protein dibedakan menjadi dua kategori yaitu

- a. Protein sederhana

Produk hidrolisisnya hanya berupa asam amino, berdasarkan kelarutannya dibedakan menjadi empat kelompok: albumin (larut di dalam air dan larutan garam), globulin (kurang larut air tetapi larut di larutan garam), prolamin (larut di dalam alkohol 70-80% tetapi tidak larut di air dan alkohol absolut) dan glutelin (hanya larut di asam atau alkali).

- b. Protein kompleks

Produk hidrolisisnya berupa asam amino dan bagian bukan asam amino yang disebut gugus prostetik, contohnya nukleoprotein atau histon (asam amino yang berikatan dengan asam nukleat) dan glikoprotein (berikatan dengan karbohidrat).

Menurut Murray *et al.* (2009), berdasarkan strukturnya, protein dibedakan menjadi empat kelas yaitu

- a. Struktur primer

Struktur protein berupa sekuens asam amino dalam suatu rantai polipeptida, contohnya : Leu-Ala-Trp-Cys.

- b. Struktur sekunder

Struktur protein berupa pelipatan segmen-segmen pendek (3 sampai 30 residu) polipeptida yang berdekatan menjadi unit-unit yang teratur secara geometris. Struktur sekunder protein dibagi menjadi dua bentuk yaitu α -heliks dan β -sheet.

- c. Struktur tersier

Struktur tersier merupakan penyusunan unit struktural sekunder menjadi unit fungsional yang lebih besar. Istilah struktur tersier merujuk pada konformasi tiga dimensi, struktur ini menunjukkan bagaimana gambaran struktur sekunder-heliks, lembaran, tekukan, belokan, dan gelung-terusun membentuk domain

dan bagaimana domain-domain ini berhubungan satu sama lain dalam ruang. Domain adalah suatu bagian dari struktur protein yang mampu melakukan tugas kimia atau fisika tertentu, misalnya mengikat substrat atau ligan lain.

d. Struktur kuartener

Struktur kuartener merupakan jumlah dan tipe unit polipeptida pada protein oligomerik dan susunan spasialnya.

2.3 Isolasi Protein

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

2.3.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah awal untuk mendapatkan sampel *crude* protein dengan cara memisahkan protein dari berbagai substansi dalam sampel secara selektif (Berkelman and 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 (glutelin), dan protein larut alkohol (prolamin) (Ju *et al.*, 2001).

2.3.2 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 di dalam air, tetapi menghasilkan peningkatan temperatur yang signifikan. Seluruh pelarut organik cenderung mendenaturasi protein, khususnya temperatur di atas 0°C (Englard and Seifter, 1990).

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 mengekstrak 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).

2.4 Hidrolisis Protein

Protein dengan berat molekul yang rendah dapat diperoleh dengan menghidrolisis protein secara kimia (hidrolisis asam dan basa) dan enzimatik. Hidrolisis secara kimia sulit dikontrol, mendegradasi asam amino, dan menghasilkan produk toksis seperti *lysino-alanine*. Hidrolisis enzimatik bekerja tanpa merusak asam amino, tidak menggunakan suhu dan pH yang ekstrim seperti hidrolisis kimia (McCarthy *et al.*, 2013). Hidrolisis protein biasanya 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).

2.4.1 Parameter Hidrolisis

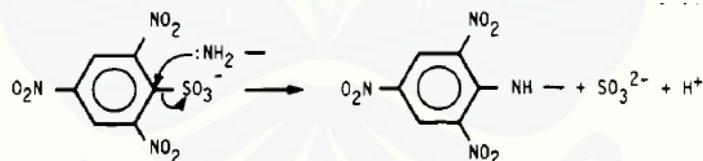
Parameter hidrolisis yang mempengaruhi proses hidrolisis yaitu pH, waktu, perbandingan enzim dan substrat, serta temperatur (Hoo and Babji, 2011). Proses hidrolisis enzimatik dalam menghasilkan protein hidrolisat dapat dikontrol dengan mengetahui distribusi berat molekulnya, komposisi peptida, dan derajat

hidrolisisnya (Sujith and Hymavathi, 2011). Derajat hidrolisis (DH), merupakan parameter utama 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 terhidrolisis, h_{tot} tergantung pada komposisi asam amino sebelum dihidrolisis (Nielsen *et al.*, 2001). h_{tot} dikalkulasikan sebagai penjumlahan total asam amino per 1 gram protein (Adler-Nissen, 1979), jumlah total asam amino didefinisikan sebagai 100% sampel terhidrolisis dengan menggunakan perlakuan 6 N HCl pada 110°C selama 24 jam didalam vacuum oven (Chel-Guerrero *et al.*, 2012). h dikalkulasikan sebagai konsentrasi dalam miliequivalen/gram protein dari terbentuknya kelompok α -amino selama hidrolisis (Adler-Nissen, 1979).

Metode yang digunakan untuk memonitoring DH selama hidrolisis protein antara lain 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 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi reagen TNBS dengan asam amino (Adler-Nissen, 1979)

2.4.2 Alkalase

Alkalase diproduksi dari *Bacillus licheniformis*, termasuk famili subtilisins dalam kelompok serine protease dan merupakan enzim komersial yang digunakan untuk memproduksi protein hidrolisat (Sujith and Hymavathi, 2011). Enzim ini bekerja optimal pada suhu 50°C, pH 8, buffer 0,1 M Kpi, selama 7-8 jam dan E/S 0,2 % (Siswoyo and Hosogawa, 2014), serta toleransi pH yang luas antara pH 5-11 (Peksa and Miedzianka, 2014). Alkalase termasuk golongan endoprotease (Peksa and Miedzianka, 2014) yang menghidrolisis ikatan peptida pada

pertengahan rantai polipeptida bukan dari sisi C terminal atau N terminal (Sujith and Hymavathi, 2011). Alkalase menghidrolisis ikatan peptida pada spesifisitas luas yaitu ikatan peptida yang memiliki gugus fungsional (*side chain*) berupa asam amino hidrofobik (Sujith and Hymavathi, 2011) seperti asam amino dengan gugus aromatik: Tyr, Trp, dan Phe (Peksa and Miedzianka, 2014).

2.5 Analisis Kuantitatif Protein

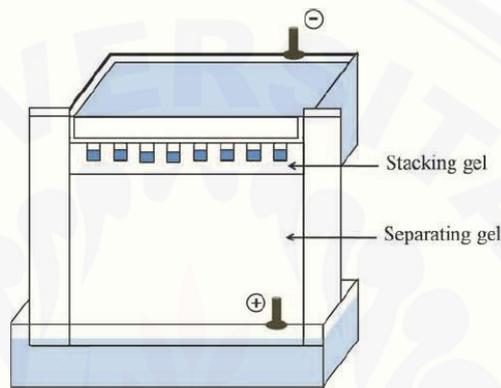
Metode Bradford merupakan metode yang sering digunakan untuk menentukan kadar protein karena paling mudah, cepat, dan cukup akurat dibandingkan metode lainnya (Bradford, 1976). Kelemahan uji Bradford yaitu reaksi terhambat jika di dalam sampel ada detergen dan memiliki rentang linier pada rentang pendek, biasanya 2-120 µg/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 coklat muda jernih (Bintang, 2010).

2.6 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 hampir 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 hampir semua interaksi kovalen dalam protein alami, juga ditambahkan merkaptoetanol 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 poliakrilamida dalam bentuk lempeng tipis tegak lurus. Pemasangan gel elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 2.4. 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).



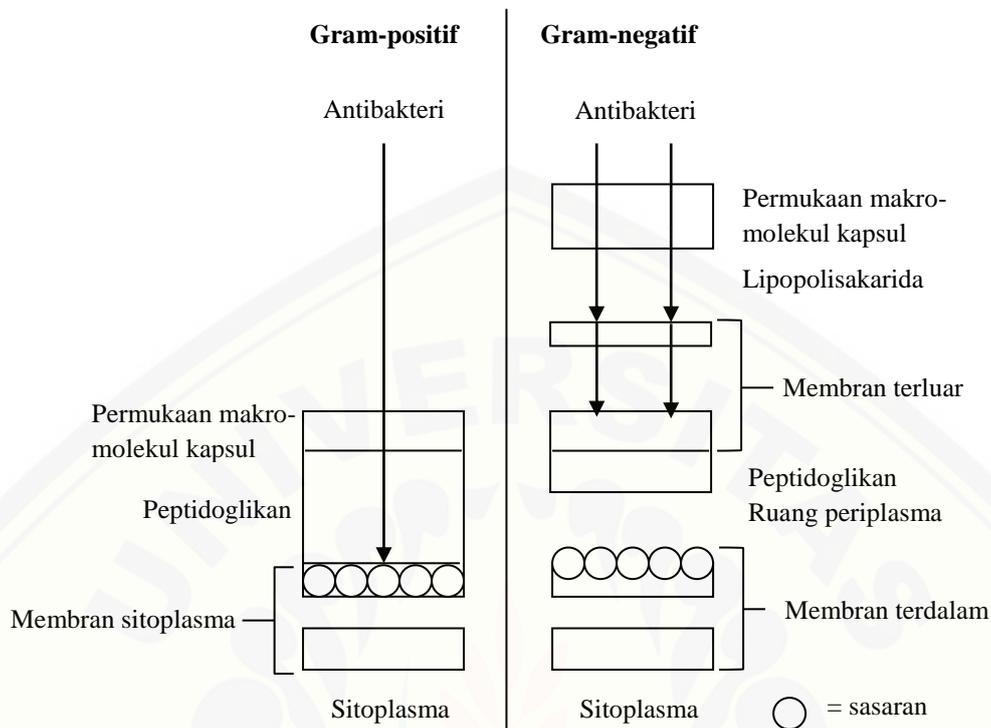
Gambar 2.4 Pemasangan gel elektroforesis poliakrilamida (Sattayasai, 2012)

2.7 Bakteri

2.7.1 Karakteristik

Bakteri adalah mikroorganisme bersel satu, berkembangbiak dengan cara membelah diri, mengandung struktur yang dibatasi membran di dalam sitoplasmanya, serta hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop (Dwijoseputro, 1990). Dinding sel bakteri merupakan struktur yang unik secara biokimia. Dinding sel pada beberapa bakteri mengandung murein, yang juga dikenal sebagai peptidoglikan atau mukopeptida. Lapisan peptidoglikan ini tidak ditemukan pada organisme eukariotik (Fardiaz, 1992).

Bakteri Gram positif dan Gram negatif dibedakan berdasarkan reaksi terhadap perwarnaan gram dan susunan dinding selnya (Pelczar dan Chan, 1986). Secara skematik, perbedaan dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif ditunjukkan pada Gambar 2.5. Secara umum, perbedaan sifat bakteri Gram positif dan Gram negatif disajikan pada Tabel 2.2.



Gambar 2.5 Diagram skematik dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif (Siswandono dan Soekardjo, 2008)

Tabel 2.2 Perbedaan sifat bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif

Ciri	Perbedaan relatif	
	Gram positif	Gram negatif
Struktur dinding sel	Tebal (15-80 nm)	Tipis (10-15 nm)
Komposisi dinding sel	Berlapis tunggal (mono)	Berlapis tiga (multi)
	Kandungan lipid rendah (1-4%)	Kandungan lipid tinggi (11-22%)
	Peptidoglikan ada sebagai lapisan tunggal; komponen utama merupakan lebih dari 50% berat kering pada beberapa sel bakteri	Peptidoglikan ada di dalam lapisan kaku sebelah dalam; jumlahnya sedikit, merupakan sekitar 10% berat kering
	Asam tekoat	Tidak ada asam tekoat
Kerentanan terhadap penicillin	Lebih rentan	Kurang rentan
Pertumbuhan dihambat oleh zat-zat warna dasar, misalnya ungu kristal	Pertumbuhan dihambat dengan nyata	Pertumbuhan tidak begitu dihambat
Persyaratan nutrisi	Relatif rumit pada banyak spesies	Relatif sederhana
Resistensi terhadap gangguan fisik	Lebih resisten	Kurang resisten

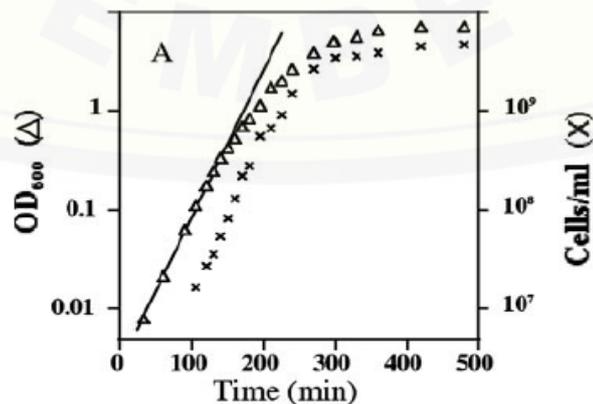
Sumber : Pelczar dan Chan (1986)

2.7.2 *Escherichia coli*

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* menurut NODS Taxonomic Code (1996) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Monera
Filum : Bacteria
Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, tidak membentuk spora, tidak berkapsul, umumnya mempunyai fimbria, bersifat *motile*, dan merupakan flora normal pada saluran pencernaan serta bisa berubah menjadi *oportunis* patogen bila hidup di luar usus. Suhu optimum pertumbuhannya yaitu 37°C, sedangkan pH optimumnya yaitu antara 7,0–7,5 (Supardi dan Sukamto, 1999). Bakteri dapat tumbuh pada kondisi aerob dan anaerob serta tidak memproduksi enterotoxin (Public Health Agency of Canada, 2011). Manifestasi klinik patogenesis bakteri yaitu gastroenteritis akut, abses apendikular, peritonitis (Sonibare and Abegunde, 2012), dan diare akut diikuti muntah serta mual (Public Health Agency of Canada, 2011). Kurva pertumbuhan *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 2.6.



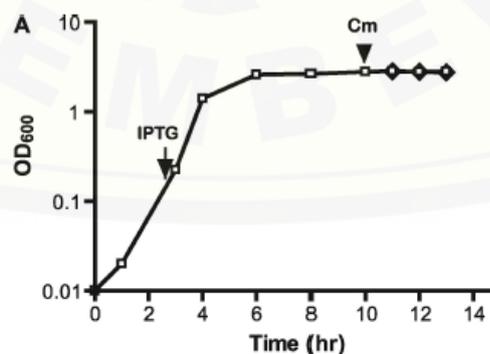
Gambar 2.6 Kurva pertumbuhan *E. coli* (Sezonov *et al.*, 2007)

2.7.3 *Bacillus subtilis*

Klasifikasi bakteri *Bacillus subtilis* menurut Ariani (2000) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Monera
Filum : Bacteria
Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Famili : *Bacillaceae*
Genus : *Bacillus*
Spesies : *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis adalah bakteri Gram positif, berbentuk batang, membentuk endospora untuk melindungi diri dari kondisi lingkungan yang ekstrim sehingga lebih tahan terhadap panas dan bahan kimia serta tidak mudah dimusnahkan (Muhammadi-Sichani and Parsafer, 2012). Pertumbuhan optimal pada suhu 37°C (Birge, 1994) dan bersifat fakultatif anaerob (Abo-State *et al.*, 2012). *Bacillus subtilis* mempunyai kemampuan menghasilkan enzim diantaranya amilase, protease, dan lipase (Ariani, 2000). Bakteri tersebut sering ditemukan di permukaan kulit, saluran pencernaan, epitel yang luka, di tangan dan kaki manusia, hewan ternak, dan tanah (Gonzalez, 2011). Bakteri tersebut sering menjadi penyebab utama keracunan makanan (Sonibare and Abegunde, 2012). Kurva pertumbuhan *B. subtilis* dapat dilihat pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Kurva pertumbuhan *B. subtilis* (Yang *et al.*, 2011)

2.8 Peptida Antibakteri

2.8.1 Karakteristik

Bahan antibakteri merupakan bahan yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) dan ada yang bersifat membunuh bakteri (bakterisid) (Pelczar dan Chan, 1988).

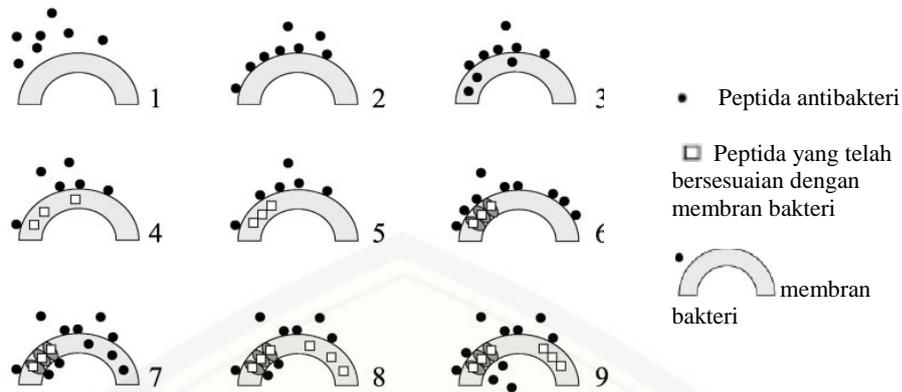
Protein sebagai agen antibakteri atau yang biasa disebut peptida antibakteri mempunyai nilai lebih yaitu kemudahan dan kecepatan diproduksi (Marshall and Arenas, 2003). Menurut Segura-Campos *et al.* (2013) karakteristik peptida antibakteri biasanya memiliki struktur yang terdiri kurang lebih 80 asam amino (umumnya L-asam amino), bermuatan positif (biasanya berupa residu lisin dan arginin), amfifatik, dan membrannya aktif (biasanya dalam bentuk struktur amfifatik *folding* 3 dimensi yang distabilkan oleh ikatan disulfida), yang akan beradaptasi berubah menjadi struktur liniernya dengan mengurangi pelipatannya, menjadi bentuk seperti heliks amfifatik, lekukan, atau bentuk lainnya, dimana domain muatan positif hidrofilik dipisahkan dengan jelas dari domain hidrofobik. Heliks amfifatik ini beradaptasi baik terhadap pembentukan pertemuan antara regio polar dan nonpolar, misalnya bagian interior protein yang hidrofobik dengan lingkuangn airnya. Kelompok-kelompok heliks amfifatik dapat menciptakan suatu kanal, atau pori yang memungkinkan molekul polar tertentu menembus membran sel hidrofobik (Murray *et al.*, 2009). Beberapa jenis peptida antibakteri dari tanaman yang telah diteliti dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Peptida antibakteri dari tanaman

Nama peptida	Sumber tanaman	Bakteri yang dihambat	Referensi
Napin	<i>Brassica rapa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Mycobacterium phlei</i>	Ngai and Ng, 2004
Pg-AMP1	<i>Psidium guajava</i>	<i>Klebsella sp.</i> <i>Proteus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumonia</i>	Pelegriani <i>et al.</i> , 2008
Protamin-1	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Clavibacter michiganensis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Escherichia coli</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005 Kim <i>et al.</i> , 2006
Ocatin	<i>Oxalis tuberosa</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> <i>Serratia marscescens</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Agrobacterium radiobacter</i>	Flores <i>et al.</i> , 2002

2.8.2 Mekanisme Kerja

Model mekanisme kerja peptida antibakteri secara umum dapat dilihat pada Gambar 2.8. Pertama, terjadi interaksi ikatan elektrostatik antara kationik peptida dan komponen anionik yang menyelubungi sel bakteri (gugus fosfat lipopolisakarida pada Gram negatif dan asam lipoteisoid pada Gram positif). Kedua, terjadi interaksi hidrofobik pada permukaan sel target dengan peptida antibakteri. Ketiga, penggabungan dan akumulasi pergerakan awal peptida yang mengubah formasi pada membran bakteri. Keempat, peralihan tahap penyesuaian peptida dan penyisipan ke dalam membran bakteri lebih lanjut. Kelima, penggabungan dan pengikatan senyawa peptida di dalam membran bakteri. Keenam, pembentukan kerja peptida yang kompleks seperti mengubah konfigurasi dan membentuk lubang pada membran. Ketujuh, perpindahan peptida menuju bagian dalam sitoplasma. Kedelapan, penimbunan peptida yang terus berjalan. Kesembilan, akses dan target fungsi peptida antibakteri untuk menghambat komponen yang aktif pada bakteri (Yeaman and Yount, 2003).



Gambar 2.8 Model mekanisme kerja peptida antibakteri (Yeaman and Yount, 2003)

2.9 Ampisilin

Ampisilin merupakan turunan antibiotik penisilin yang termasuk dalam golongan antibiotik beta laktam. Antibiotik tersebut memiliki spektrum lebih luas menghambat aktivitas bakteri Gram positif dan Gram negatif dibandingkan penisilin. Ampisilin berperan sebagai kompetitif inhibitor terhadap enzim transpeptidase, dimana enzim tersebut dibutuhkan oleh bakteri untuk membentuk dinding sel. Penghambatan terhadap pembentukan dinding sel bakteri menyebabkan lisis pada sel bakteri. Perbedaan ampisilin dengan penisilin terletak pada penambahan gugus amino ke dalam molekul penisilin menjadi ampisilin, penambahan gugus amino tersebut membantu penetrasi obat ke dalam membran bakteri Gram negatif. Oleh karena itu, ampisilin lebih efektif menghambat aktivitas bakteri Gram negatif dalam merusak dinding sel bakteri dibandingkan penisilin (Sharma *et al.*, 2013).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian di Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advance Science and Technology*) Universitas Jember. Waktu Penelitian pada bulan Mei sampai Desember 2014.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang sudah masak secara fisiologis, ditandai dengan kulit biji berwarna merah tua. Biji melinjo didapat dari petani di daerah Kalibaru Kabupaten Banyuwangi, Jawa Timur.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

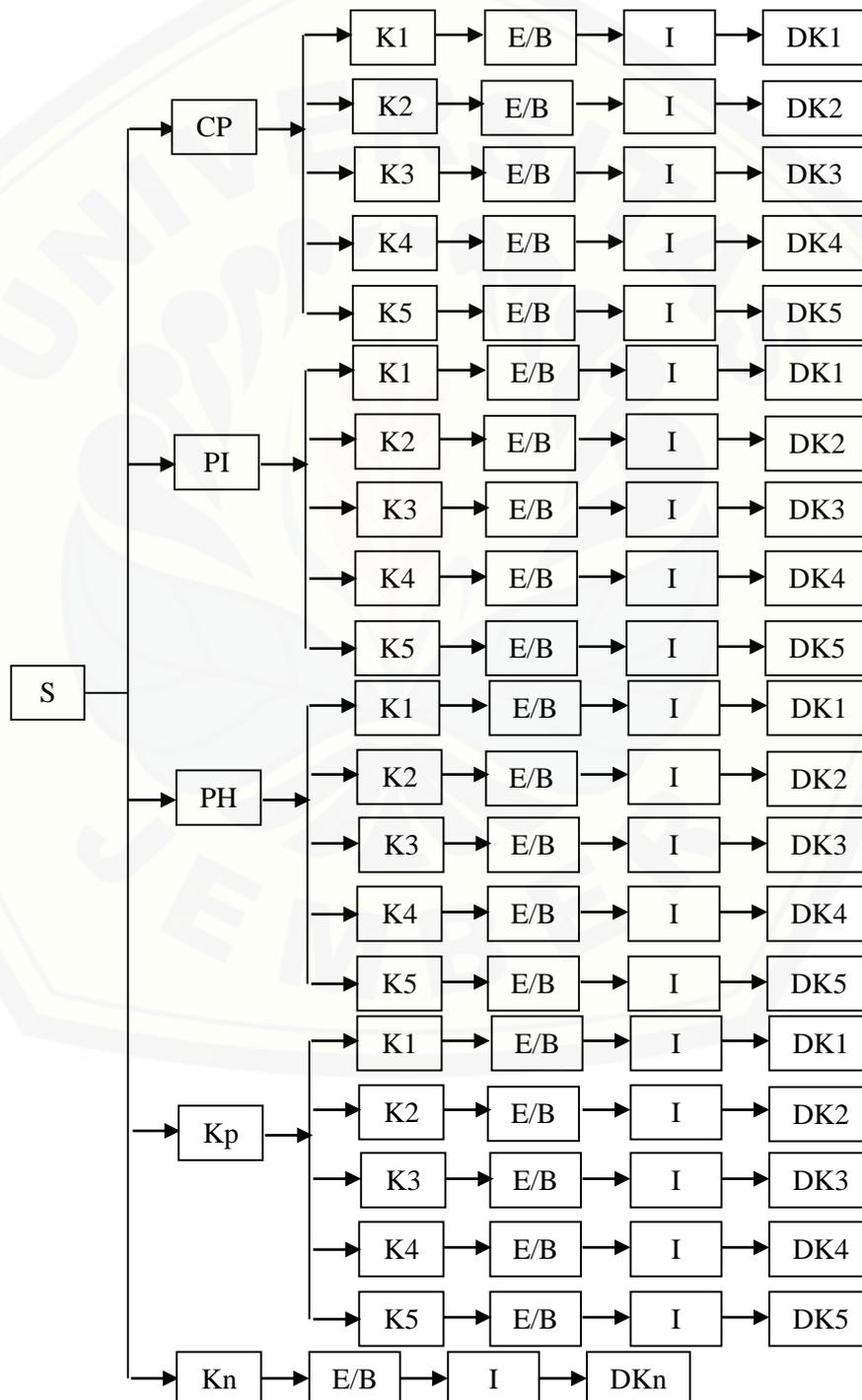
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *shaker incubator* (Stuart SI600), oven (Carbolite), spektrofotometer (Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), SDS-PAGE (Bio-Rad), *comb*, sentrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), stirer, vortex, *microwave*, alat gelas, timbangan analitik, blender, autoklaf, mikropipet, *dry block heater* (Techne), LAF (*Laminar Air Flow*) (Nuair), dan *siringe* Hamilton.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades; kain kasa; 1 M HCl; 1 M NaOH; 10 M HCl; 0,1 M Na₂SO₃; etanol 70%; 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*; antibiotik ampicilin; bakteri *Escherichia coli* DH5α dan *Bacillus subtilis* berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Jember; media LB (Luria Bertani); *soft agar* (Nutrient agar 1 %); pereaksi Bradford; 0,2 M buffer fosfat pH 8; 0,2 M buffer fosfat pH 7,4; BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma); 0,1% TNBS

; standar L-Leucine (Wako), dan marker protein (*ELPIS BIOTECH'S EBM-1018* : 100 KDa, 70 KDa, 50 KDa, 40 KDa, 30 KDa, 20 KDa, dan 15 KDa).

3.5 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *posttest only control group design*.



- CP : *Crude protein* biji melinjo
PI : Protein isolat biji melinjo
PH : Protein hidrolisat biji melinjo
Kn : Kontrol negatif (akuades)
Kp : Kontrol positif (ampisilin)
K1 : Perlakuan 1 dengan konsentrasi protein 5 $\mu\text{g/mL}$
K2 : Perlakuan 2 dengan konsentrasi protein 10 $\mu\text{g/mL}$
K3 : Perlakuan 3 dengan konsentrasi protein 25 $\mu\text{g/mL}$
K4 : Perlakuan 4 dengan konsentrasi protein 50 $\mu\text{g/mL}$
K5 : Perlakuan 5 dengan konsentrasi protein 100 $\mu\text{g/mL}$
E/B : Perlakuan berupa kontak dengan *Escherichia coli* atau *Bacillus subtilis*
I : Inkubasi
DKn : Data hasil perlakuan Kn
DK1 : Data hasil perlakuan K1
DK2 : Data hasil perlakuan K2
DK3 : Data hasil perlakuan K3
DK4 : Data hasil perlakuan K4
DK5 : Data hasil perlakuan K5

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi sampel uji (*crude protein*, protein isolat, dan protein hidrolisat biji melinjo).

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ada tidaknya zona hambatan dan IC_{50} sampel uji terhadap bakteri uji.

3.6.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah pembuatan inokulum bakteri uji, media agar, suhu dan waktu inkubasi, suhu dan waktu sterilisasi, dan prosedur kerja.

3.7 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini yaitu

- a. Zona hambat sampel adalah kemampuan sampel menghambat atau mematikan bakteri yang ditunjukkan sebagai zona bening sampel.
- b. IC_{50} adalah besarnya konsentrasi sampel yang mampu memberikan penghambatan sebesar 50%.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Ekstraksi dan Isolasi Protein Biji Melinjo

Sebanyak 30 gram biji melinjo yang telah dipisahkan dari kulitnya dihaluskan menggunakan blender dengan menambahkan akuades 90 mL, kemudian, disaring menggunakan kain kasa dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm ($15^{\circ}C$). Supernatan diambil dan peletnya dibuang. Supernatannya disebut *Crude Protein* (Gg-CP) dan selanjutnya digunakan untuk isolasi protein. Jika tidak segera digunakan, sampel disimpan pada $-80^{\circ}C$.

Isolasi protein menggunakan metode presipitasi isoelektrik seperti yang dijelaskan Salcedo-Chavez *et al.* (2002) dengan sedikit modifikasi. *Crude Protein* diatur pH-nya menjadi pH 4,0 dengan penambahan 1 M HCl untuk mengendapkan protein biji melinjo dengan jumlah maksimal (Siswoyo dan Sugiharto, 2012), kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm ($15^{\circ}C$). Peletnya diambil dan supernatannya dibuang, kemudian diresuspensikan dengan akuades serta diatur pH-nya menjadi pH 8,0 dengan penambahan 1 M NaOH, hasilnya disebut Protein Isolat terlarut (Gg-PI). Setelah itu, sampel disimpan pada $-80^{\circ}C$ sampai digunakan lebih lanjut.

3.8.2 Hidrolisis Enzimatik Protein Isolat

Hidrolisis Gg-PI menggunakan alkalase yang telah diencerkan 10X dari stok alkalase 24L FG menggunakan 0,2 M buffer fosfat pH 7,4. Gg-PI dengan konsentrasi 10 mg/mL dihidrolisis dengan 20 μ L alkalase yang sudah diencerkan, kemudian diinkubasi 50⁰C selama 6 jam. Setelah itu, Gg-PI yang telah diinkubasi dipanaskan 95⁰C selama 10 menit untuk menginaktivasi enzim, kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5.000 rpm (15⁰C). Supernatannya diambil dan peletnya dibuang, supernatannya disebut Protein Hidrolisat (Gg-PH), kemudian disimpan pada -80⁰C sampai digunakan lebih lanjut (Siswoyo dan Sugiharto, 2012).

3.8.3 Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut

Konsentrasi protein terlarut diukur menggunakan metode Bradford (1976). Sebanyak 5 μ L sampel ditambahkan dengan 45 mL akuades dan 950 mL pereaksi Bradford, kemudian diinkubasi selama 15 menit. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kurva standar BSA digunakan untuk mengetahui konsentrasi protein terlarut sampel.

3.8.4 Pengukuran Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan metode TNBS (Adler-Nissen, 1979). Jumlah total asam α -amino ditentukan dalam sampel (Gg-PI) dengan cara dihidrolisis secara asam (6M HCl pada 110⁰C selama 24 jam). Sebanyak 200 μ L Gg-PI ditambahkan ke dalam 300 μ L 10 M HCl, kemudian diinkubasi 110⁰C selama 24 jam, hasil hidrolisisnya disebut Gg-PI_{asam}. 10 μ L Gg-PI_{asam} diencerkan dengan akuades sampai 75 μ L, kemudian diambil 25 μ L untuk diukur total asam α -amino menggunakan metode TNBS. Sebanyak 25 μ L (Gg-PI yang telah dihidrolisis asam dan Gg-PH) masing-masing dicampur dengan 400 μ L 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 200 μ L 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada 50⁰C. Reaksi dihentikan dengan penambahan 2 mL 0,1 M Na₂SO₃ dan didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya pada 420 nm. Kurva standar L-Leucine

digunakan untuk mengetahui konsentrasi asam amino sampel. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan: $DH = h/h_{tot} \times 100\%$; dimana h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

3.8.5 Elektroforesis SDS-PAGE

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

SDS-reducing buffer ditambahkan ke dalam sampel protein 1:1 (v/v) kemudian dipanaskan pada suhu 96°C selama 3 menit. Sampel Gg-CP, Gg-PI, dan Gg-PH yang sudah ditambahkan *SDS-reducing buffer* dengan jumlah protein yang sama yaitu $48,75 \mu\text{g}$ serta marker protein sebanyak $5 \mu\text{L}$ dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan *syringe* Hamilton, kemudian *dirunning* pada 25-80 volt sampai *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 0,5 jam untuk mewarnai pita protein. Setelah itu, larutan staining dituang kembali pada wadahnya kemudian dicuci dengan akuades. 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 ± 2 menit. Proses pencucian dilakukan 2-3 kali atau sampai pita protein terlihat jelas. Berat molekul protein dapat diperkirakan dengan membandingkan antara pola protein sampel dengan marker protein yang telah diketahui berat molekulnya.

3.8.6 Uji Aktivitas Antibakteri Protein Biji Melinjo

a. Pembuatan Inokulum Bakteri Uji

Pembuatan inokulum bakteri dengan cara menginokulasi 1-2 ose biakan murni bakteri pada 2 mL LB cair, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C, 150 rpm selama 18-24 jam di dalam inkubator. Setelah itu, 100 µL kultur bakteri di inokulasi pada 2 mL LB cair selama 2-3 jam. Pengukuran konsentrasi bakteri menggunakan metode *optical density* (OD) spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm (Myers *et al.*, 2013) yaitu pada absorbansi sekitar 0,6 sampai 1 (Sezonov *et al.*, 2007), rata-rata 1×10^8 - 1×10^9 CFU/mL (Song *et al.*, 2012).

b. Zona Hambat

Analisis kualitatif zona hambat bakteri menggunakan teknik *spot test* (Balestra *et al.*, 2009) dengan sedikit modifikasi. *Soft agar* di dalam tabung ulir steril dipanaskan sampai cair, setelah panas kuku ($\pm 45^0$ C) sebanyak 300 µL inokulum bakteri dimasukkan ke dalam *soft agar*. Setelah itu, dihomogenkan dan dituang di atas media LB padat. Setelah agar memadat, sampel (sudah disaring dengan filter 0,2 µm) sebanyak 5 µL dengan konsentrasi yang sama yaitu 19,5 ug/5 µL dan kontrol negatif (akuades), ditetaskan diatas permukaan agar tersebut, kemudian diinkubasi selama 12 -18 jam (37⁰C) dan dilihat ada tidaknya zona bening sampel. Ampisilin (kontrol positif) ditambahkan jika tidak ditemukan zona hambatan pada sampel uji untuk memonitoring uji aktivitas.

c. Penentuan IC₅₀

Aktivitas antibakteri secara kuantitatif diukur menggunakan metode *tube dilution* (Iwalokun *et al.*, 2004). Tabung ulir berisi 1 mL media LB cair steril digunakan sebagai media uji. Sampel uji sebanyak 1 mL (sudah disaring dengan filter 0,2 µm) dimasukkan ke dalam media uji dengan konsentrasi 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, dan 100 µg/mL, kemudian inokulum bakteri uji sebanyak 30 µL dimasukkan kedalam masing-masing sampel uji. Media uji dan inokulum bakteri sebanyak 30 µL digunakan sebagai kontrol negatif. Setelah itu,

diinkubasi selama 4 jam dengan *shaker incubator* pada 150 rpm dan 37⁰C. Uji aktivitas diulangi tiga kali pada hari yang berbeda. Pengukuran jumlah kepadatan bakteri menggunakan metode *optical density* (OD) spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm (Myers *et al.*, 2013), kemudian dihitung penghambatan pertumbuhan bakteri sebagai berikut :

$$\text{penghambatan} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100 \%$$

dimana A_k adalah absorbansi kontrol dan A_s adalah absorbansi sampel uji. Nilai IC_{50} ditentukan dari metode regresi linear antara penghambatan sebagai sumbu y dan log konsentrasi sampel uji sebagai sumbu x (Wang *et al.*, 2010).

3.9 Analisis Data

Data nilai IC_{50} yang diperoleh dianalisis menggunakan uji parametrik *One-Way Anova* dan dilanjutkan uji *post-hoc* tipe LSD untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan secara signifikan. Sebelum dilakukan uji *One-Way Anova* data terlebih dahulu diuji normalitas menggunakan *Shapiro Wilk Test* ($\alpha = 5\%$), dan diuji homogenitasnya menggunakan *Levene's Homogeneity of Vaiance Test* ($\alpha = 5\%$).

3.10 Skema Kerja Penelitian

