



**AKTIVITAS FRAKSI PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL HIDROKSIL
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Zahrina Amalia Eka N.
NIM 122010101007**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**AKTIVITAS FRAKSI PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL HIDROKSIL
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh

Zahrina Amalia Eka N.
NIM 122010101007

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dan Nabi Muhammad SAW;
2. Kedua orang tua saya Bapak Ir. R. Bangun Ari Susetyo dan Ibu Dr.Ir.Parawita Dewanti, M.P.
3. Guru-guru TK Al-furqan Jember, SD Al-furqan Jember, SMPN 2 Jember, SMAN 1 Jember dan dosen-dosen Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
4. Keluarga besar Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
5. *Center for Development of Advance Science and Technology (CDAST)* Universitas Jember.
6. Bangsa dan Tanah Airku Indonesia.

MOTTO

“Maka bersabarlah engkau (Muhammad) dengan kesabaran yang baik”
(terjemahan QS: Al-Ma’arij:5)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Zahrina Amalia Eka Nurfadillah

NIM : 122010101007

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah dengan judul “AKTIVITAS FRAKSI PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.) TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL HIDROKSIL 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, 18 Januari 2016

(Zahrina Amalia Eka N.)
NIM 122010101007

SKRIPSI

**AKTIVITAS FRAKSI PROTEIN BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
TERHIDROLISIS TERHADAP RADIKAL HIDROKSIL
SECARA *IN VITRO***

Oleh

Zahrina Amalia Eka N.

NIM 122010101007

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Skripsi Berjudul “**Aktivitas Fraksi Protein Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) Terhidrolisis Terhadap Radikal Hidroksil Secara *in Vitro***” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : 18 Januari 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

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

Dr.rer.biol.hum.dr.Erma Sulityaningsih,M.Si..
NIP 197702222002122001
Penguji II,

dr. Hairrudin, M.Kes.
NIP 197510112003121008

dr. Ika Rahmawati Sutejo M.Biotech
NIP 198408192009122003

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Jember

dr. Eny Suswati, M. Kes.
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Aktivitas Fraksi Protein Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) Terhidrolisis terhadap Radikal Hidroksil secara *In Vitro*; Zahrina Amalia Eka N.; 122010101007; 2016:56 Halaman; Fakultas Kedokteran; Universitas Jember.

Penyakit tidak menular atau *non communicable disease* memiliki prevalensi yang semakin lama semakin meningkat. Terdapat beberapa faktor risiko yang berhubungan erat dengan terjadinya penyakit tersebut, salah satunya adalah paparan radikal bebas. *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan salah satu kelompok radikal bebas. Secara fisiologis, ROS terbentuk selama metabolisme seluler dan aktivitas fisiologis, dan memiliki peranan penting dalam *cell signalling*, apoptosis, ekspresi gen dan transportasi ion. Radikal Hidroksil ($\bullet\text{OH}$) merupakan salah satu ROS yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan DNA melalui mekanisme pemutusan ikatan hidrogen antar basa DNA. Radikal bebas ini diantaranya berasal dari reaksi Haberr-Weiss dan Fenton.

Untuk mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas diperlukan suatu senyawa antioksidan. Antioksidan dapat melindungi sel dari radikal bebas karena bertindak sebagai donor elektron, sehingga radikal bebas menjadi stabil dan pemutusan rantai hidrogen antar basa DNA dapat dicegah. Penggunaan ekstrak protein atau *purified* protein dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, salah satunya adalah protein biji melinjo (*Gnetum gnemon L.*). Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa protein terhidrolisis dari biji melinjo berpotensi sebagai antioksidan yang efektif untuk mengikat radikal bebas, namun belum diketahui fraksi protein biji melinjo yang paling efektif yang dapat menghambat radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi protein biji melinjo terhidrolisis manakah yang memiliki potensi paling kuat dalam meredam radikal hidroksil, mengetahui pengaruh fraksi protein biji melinjo terhidrolisis terpilih dalam uji peredaman radikal hidroksil dan hidrogen peroksida serta kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA secara *in vitro*.

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Sampel uji adalah fraksi protein (Gg-FP) biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis. Protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) difraksinasi berdasarkan perbedaan ukuran molekulnya menggunakan FPLC. Perbedaan konsentrasi fraksi protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-FP) digunakan pada pengujian aktivitas peredaman radikal hidroksil (\bullet OH) dan aktivitas peredaman hidrogen peroksida. Konsentrasi protein sebanyak 15 μ g digunakan dalam pengujian kemampuan proteksi biji melinjo terhadap kerusakan DNA dalam gel *agarose* 1%. Hasil yang diperoleh berupa degradasi deoksiribosa dalam gel *agarose* 1% yang menunjukkan perbandingan bentuk pita DNA *supercoiled*, *open circular*, dan *linear*. Data dianalisis menggunakan regresi linier untuk mengetahui pengaruh fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terhadap penghambatan radikal bebas dan menentukan nilai IC_{50} .

Hasil penelitian menunjukkan semua fraksi protein memiliki pengaruh terhadap uji peredaman radikal hidroksil dan uji peredaman hidrogen peroksida. Fraksi 3 protein biji melinjo (Gg-FP3) merupakan hasil fraksinasi dari protein biji melinjo yang memiliki kemampuan peredaman terhadap radikal hidroksil dan hidrogen peroksida paling kuat dibandingkan dengan fraksi protein yang lain. Selain itu, Gg-FP3 juga memiliki kemampuan proteksi DNA terhadap radikal hidroksil. Proses pemurnian protein biji melinjo terhidrolisis (Gg-PH) menggunakan FPLC diketahui dapat meningkatkan aktivitas antioksidan lebih besar jika dibandingkan dengan protein terhidrolisis yang tidak dimurnikan.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah fraksi 3 protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis (Gg-FP3) memiliki potensi paling kuat dalam meredam radikal hidroksil, memiliki pengaruh terhadap uji peredaman radikal hidroksil dengan nilai IC_{50} $0,0345 \pm 0,003 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, memiliki pengaruh terhadap uji peredaman hidrogen peroksida dengan nilai IC_{50} $0,022 \pm 0,003 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, serta memiliki kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA.

PRAKATA

Puji Syukur atas ridho dan rahmat yang diberikan oleh Allah S.W.T sehingga penelitian dengan judul “Aktivitas Fraksi Protein Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon* L.) Terhidrolisis Terhadap Radikal Hidroksil Secara *in Vitro*” dapat terselesaikan. Penulis menyadari sepenuhnya bahwa masih banyak terdapat kekurangan dan kelemahan, baik dari teknik penulisan maupun materi.

Banyak sekali pihak yang membantu selama berlangsungnya pembuatan skripsi ini, baik yang 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 telah mengarahkan dengan penuh kesabaran dalam penyelesaian skripsi ini;
3. Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulityaningsih, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dengan ketekunan dan kesabarannya dalam meluangkan segenap waktunya untuk membimbing saya;
4. dr. Sugiyanta, M. Ked yang telah bersedia menjadi Dosen Pembimbing Pengganti;
5. dr. Hairrudin, M.Kes dan dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech selaku penguji yang telah memberi kritik, saran, dan masukan dalam penyelesaian karya tulis ilmiah ini;
6. dr. Ancah Caesarina M., Ph.D selaku koordinator Tim KTI Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
7. Segenap Dosen Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang telah membagi ilmu pengetahuan selama ini;
8. Keluarga saya tercinta, bapak Ir. R. Bangun Ari S., ibu Dr.Ir. Parawita Dewanti, M.P. dan adik Hazmi Dwinanda Nurqistan;

9. Keluarga Besar Fakultas Kedokteran Angkatan 2012 “PANACEA”, atas kekeluargaan, semangat, dukungan dan motivasi yang kalian berikan. Kebersamaan dan kenangan ini tak akan pernah terlupakan;
10. Sahabat-sahabat seperjuangan 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;
11. Semua pihak yang telah memberikan dukungan dan bantuan baik secara moril maupun materi hingga terselesaikannya penulisan Karya Tulis Ilmiah ini;

Jember, Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
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 GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Radikal Bebas	5
2.2 Radikal Hidroksil	6
2.3 Stress Oksidatif	7
2.3.1 Peroksidasi Lipid	7
2.3.2 Kerusakan Oksidatif Protein.....	8
2.3.3 Kerusakan Oksidatif DNA.....	8
2.4 Antioksidan	8
2.5 Melinjo (<i>Gnetum gnemon L.</i>)	10

2.6 Protein	11
2.7 Analisis Protein	12
2.8 Pemurnian Protein	12
2.8.1 Kromatografi Cair dengan Metode Gel Filtrasi	13
2.8.2 Elektroforesis Gel Poliakrilamid	13
2.8.3 Elektroforesis Gel <i>Agarose</i>	14
2.9 Penentuan Aktivitas Antioksidan	15
2.9.1 Uji Peredaman ABTS	15
2.9.2 Uji Peredaman Radikal Hidroksil	15
2.9.3 Uji Peredaman Hidrogen Peroksida.....	15
2.10 Kerangka Konseptual	16
2.11 Hipotesis Penelitian	17
BAB 3 METODE PENELITIAN	18
3.1 Jenis Penelitian	18
3.2 Rancangan Penelitian	18
3.3 Sampel Penelitian	19
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.5 Alat dan Bahan	19
3.5.1 Alat.....	19
3.5.2 Bahan	19
3.6 Variabel Penelitian	20
3.6.1 Variabel Bebas.....	20
3.6.2 Variabel Terikat	20
3.6.3 Variabel Terkendali	20
3.7 Definisi Operasional	20
3.8 Prosedur Penelitian	22
3.8.1 Ekstraksi Biji Melinjo.....	22
3.8.2 Isolasi Protein Biji Melinjo.....	22
3.8.3 Ekstraksi Protein Terhidrolisis Biji Melinjo.....	22

3.8.4	Fraksinasi Biji Melinjo	23
3.8.5	Penentuan Protein Terlarut	23
3.8.6	Pengukuran Derajat Hidrolisis.....	23
3.8.7	Uji Peredaman Radikal ABTS	24
3.8.8	Pengujian Peredaman Radikal Hidroksil	24
3.8.9	Pengujian Peredaman Hidrogen Peroksida.....	25
3.8.10	Analisis Pola Pita Protein	25
3.8.11	Kultur dan Isolasi Plasmid DNA.....	26
3.8.12	Elektroforesis Gel <i>Agarose</i> 1%	27
3.9	Analisis Data	27
3.10	Alur Penelitian	28
BAB 4	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1	Ekstraksi dan Isolasi Protein Biji Melinjo	29
4.2	Hidrolisis Protein Biji Melinjo (Gg-PH).....	30
4.3	Fraksinasi Protein Biji Melinjo (Gg-FP).....	33
4.4	Aktivitas Antioksidan Fraksi Protein pada Peredaman Radikal ABTS	35
4.5	Aktivitas Antioksidan Fraksi Protein Protein pada Peredaman Radikal Hidroksil	38
4.6	Aktivitas Antioksidan Fraksi Protein Protein pada Peredaman Hidrogen Peroksida.....	43
4.7	Proteksi Terhadap Kerusakan DNA dari Fraksi Protein Biji Melinjo.....	46
BAB 5	PENUTUP.....	49
5.1	Kesimpulan.....	49
5.2	Saran	49
	DAFTAR PUSTAKA	50
	LAMPIRAN.....	57

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Jenis dan sumber ROS dan titik aksi antioksidan	6
Gambar 2.2 Reaksi Fenton.....	7
Gambar 2.3 Reaksi Haber-Weiss yang dikatalis oleh besi	7
Gambar 2.4 Reaksi langsung vitamin E (TOH) dengan $\bullet\text{OH}$ (A) dan vitamin C (AscH-) dengan $\text{ROO}\bullet$ (B) dan regenerasi vitamin E dari vitamin C (C).....	10
Gambar 2.5 Daun dan biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	11
Gambar 2.6 Ikatan peptida antar dua asam amino	11
Gambar 2.7 Kerangka konseptual penelitian	16
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian.....	18
Gambar 3.2 Skema alur penelitian.....	28
Gambar 4.1 Persentasi derajat hidrolisis (DH) protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) berdasarkan waktu	31
Gambar 4.2 Reaksi reagen TNBS dengan asam amino	31
Gambar 4.3 Elektroforesis SDS-PAGE Gg-PH.....	32
Gambar 4.4 Kromatografi FPLC protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.) ...	34
Gambar 4.5 Aktivitas peredaman radikal ABTS protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	36
Gambar 4.6 Aktivitas peredaman radikal ABTS fraksi protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	37
Gambar 4.7 Aktivitas peredaman radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) (%) protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	39
Gambar 4.8 Aktivitas peredaman radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) (%) fraksi protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	40
Gambar 4.9 Aktivitas peredaman radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) (%) Gg-FP3.....	41

Gambar 4.10 Reaksi MDA-TBA dari pengujian radikal hidroksil	42
Gambar 4.11 Aktivitas peredaman hidrogen peroksida (%) protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	43
Gambar 4.12 Aktivitas peredaman hidrogen peroksida (%) fraksi protein biji melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	44
Gambar 4.13 Aktivitas peredaman hidrogen peroksida (%) Gg-FP3	45
Gambar 4.14 Aktivitas antioksidan Gg-FP3 pada plasmid DNA.	47

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan Kandungan Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	57
B. Perhitungan Derajat Hidrolisis.....	58
C. Aktivitas Peredaman Radikal ABTS Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	60
D. Aktivitas Peredaman Radikal Hidroksil Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	61
E. Aktivitas Peredaman Hidrogen Peroksida Protein Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.)	64
F. Komposisi Bahan yang Digunakan.....	67
G. Dokumentasi Penelitian	70

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit tidak menular (PTM) atau *non communicable disease* (NCD) merupakan penyakit kronis yang tidak dapat ditularkan dari orang ke orang dan umumnya berkembang lambat (Handajani *et al.*, 2009; Dirjen PP PL, 2015). Angka kematian akibat penyakit tidak menular di Indonesia diperkirakan akan tetap tinggi dan prevalensinya akan semakin meningkat. Terdapat beberapa faktor risiko yang berhubungan erat dengan terjadinya PTM. Paparan radikal bebas merupakan salah satu faktor risiko terjadinya PTM (Maryono, 2008; WHO, 2014; Handajani *et al.*, 2009).

Radikal bebas merupakan suatu kelompok atom tak-berpasangan yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid, dan molekul lain (Murray *et al.*, 2009). Radikal bebas sangat tidak stabil dan cepat bereaksi dengan kelompok kimia lain atau zat dalam tubuh (Je *et al.*, 2009). Paparan radikal bebas berperan besar terhadap kerusakan jaringan tubuh sehingga dapat menyebabkan berbagai keadaan patologis (Maryono, 2008; Handajani *et al.*, 2009). Radikal bebas di dalam tubuh akan merusak asam lemak tak jenuh ganda pada dinding sel sehingga dinding sel menjadi rapuh, merusak basa DNA sehingga mengacaukan sistem info genetika yang dapat berlanjut pada pembentukan sel kanker, dan merusak lipid sehingga terbentuk peroksida yang dapat memicu timbulnya penyakit degeneratif (Winarsi, 2007; Je *et al.*, 2009).

Reaksi Oksidasi merupakan pencetus terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS). Senyawa yang dihasilkan disebut pro-oksidan dan senyawa yang melawan efeknya disebut antioksidan. Dalam kondisi fisiologis, selama proses metabolisme, reaksi oksidasi berlangsung setiap saat dan dapat dinetralsir oleh tubuh dengan adanya senyawa antioksidan, namun keseimbangan ini dapat berubah apabila pembentukan ROS meningkat pesat atau kadar antioksidan berkurang, keadaan ini disebut stress oksidatif (Murray *et al.*, 2009).

Radikal Hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\bullet\text{ROOH}$), anion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), dan perooksinitrit ($\bullet\text{ONOO}^-$) merupakan beberapa contoh ROS (Siswoyo *et al.*, 2011; Ahn dan Je, 2009; Murray *et al.*, 2009). Pembentukan radikal bebas seperti anion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$) dan radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) tidak dapat dihindari selama proses rantai respirasi (Je *et al.*, 2009). Radikal Hidroksil merupakan molekul khusus yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid, dan molekul lain untuk mengubah struktur molekul tersebut dan menyebabkan kerusakan jaringan (Murray *et al.*, 2009). Radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) adalah salah satu ROS yang dibentuk dari reaksi Haberr-Weiss dan Fenton. Radikal hidroksil sangat reaktif terhadap DNA melalui mekanisme pemutusan ikatan hidrogen antar basa DNA (Siswoyo, *et al.*, 2011). Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa antioksidan dapat melindungi jaringan tubuh dari efek negatif radikal bebas (Handajani *et al.*, 2009). Antioksidan dapat melindungi sel dari radikal bebas karena dapat bertindak sebagai donor elektron sehingga radikal bebas menjadi stabil (Mine *et al.*, 2010) sehingga pemutusan rantai hidrogen antar basa DNA dapat dicegah.

Dalam beberapa tahun terakhir, penggunaan ekstrak protein atau *purified* protein sebagai antioksidan mulai banyak diteliti. Protein dalam makanan seperti protein susu, protein kedelai, protein telur, protein tuna dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan (Mine *et al.*, 2010; Je *et al.*, 2007). Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) merupakan salah satu bahan pangan yang mengandung antioksidan alami dan banyak ditemukan di Indonesia. Siswoyo *et al.* (2007) menyatakan bahwa biji melinjo mengandung kadar protein yang tinggi yakni 9-10%. Protein biji melinjo ini memiliki potensi besar sebagai antioksidan yang dapat mencegah terbentuknya radikal bebas, seperti pencegahan pembentukan radikal hidroksil melalui reaksi fenton, mempunyai kemampuan mengikat Fe^{2+} , sehingga dapat melindungi kerusakan DNA (Siswoyo, 2011).

Menurut Sembodo (2015) protein hidrolisat biji melinjo dapat menghambat radikal hidroksil dan memiliki kemampuan paling baik dibandingkan dengan protein utuh dalam melindungi DNA dari kerusakan akibat radikal hidroksil, namun belum

diketahui fraksi protein biji melinjo yang paling efektif yang dapat menghambat radikal bebas. Pada penelitian ini, peneliti akan menguji aktivitas antioksidan fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*) menggunakan uji peredaman radikal hidroksil, uji peredaman hidrogen peroksida dan proteksinya terhadap kerusakan DNA. Protein biji melinjo (*Gnetum gnemon*) difraksinasi melalui kromatografi cair jenis gel filtrasi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, ditemukan beberapa permasalahan yang akan dibahas, yaitu:

- a. Fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis manakah yang memiliki potensi paling kuat dalam meredam radikal hidroksil ?
- b. Bagaimana pengaruh fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih terhadap uji peredaman radikal hidroksil?
- c. Bagaimana pengaruh fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih terhadap uji peredaman hidrogen?
- d. Bagaimana kemampuan proteksi fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih terhadap kerusakan DNA?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan permasalahan di atas, tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Mengetahui fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis yang memiliki potensi paling kuat dalam meredam radikal hidroksil.
- b. Mengetahui pengaruh fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih dalam uji peredaman radikal hidroksil.
- c. Mengetahui pengaruh konsentrasi fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih dalam uji peredaman hidrogen peroksida.
- d. Mengetahui kemampuan proteksi fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih terhadap kerusakan DNA.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

- a. Memberikan sumbangan pengembangan dan pemikiran bagi ilmu pengetahuan dan teknologi kedokteran untuk mengembangkan protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) sebagai antioksidan.
- b. Sebagai bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radikal Bebas

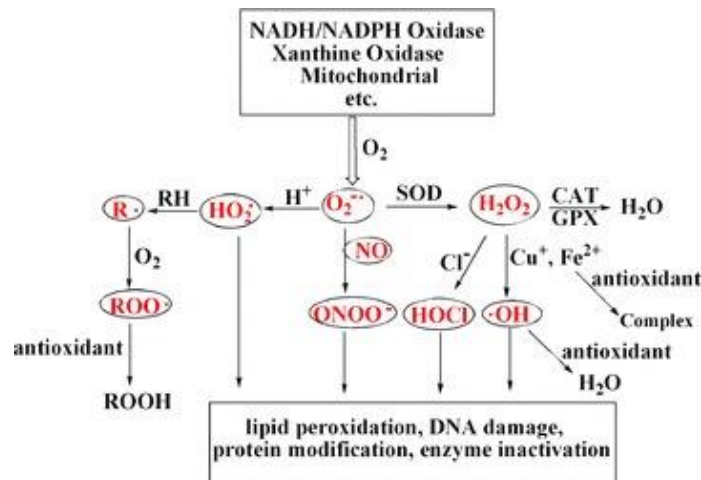
Radikal bebas adalah atom atau sekelompok atom yang memiliki elektron tidak berpasangan (Murray *et al.*, 2009) sehingga menyebabkan radikal bebas tidak stabil dan memiliki reaktivitas yang sangat tinggi. Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron dengan cara menyerang dan mengikat elektron yang ada disekitarnya. Menurut Winarsi (2007), apabila dua senyawa radikal bertemu akan terbentuk senyawa yang stabil. Sebaliknya, bila senyawa radikal bertemu dengan senyawa bukan radikal maka akan terjadi beberapa kemungkinan:

1. radikal bebas akan memberikan elektronnya kepada senyawa bukan radikal,
2. radikal bebas menerima elektron dari senyawa bukan radikal bebas,
3. radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal.

Dalam keadaan normal, tubuh manusia membentuk radikal bebas sebagai produk sampingan metabolisme sel. Selain berasal dari dalam tubuh, radikal bebas juga berasal dari luar tubuh. Asap rokok, polusi lingkungan, radiasi, obat-obatan tertentu, dan pestisida merupakan beberapa contoh sumber radikal bebas yang berasal dari luar tubuh (Lobo *et al.*, 2010).

Dalam sistem biologi, radikal bebas yang sering berasal dari molekul oksigen, nitrogen dan sulfur. Kelompok radikal bebas tersebut disebut *reactive oxygen species* (ROS), *reactive nitrogen species* (RNS) dan *reactive sulfur species* (RSS) (Lu *et al.*, 2010). Radikal Hidroksil ($\bullet\text{OH}$), anion superoksida ($\bullet\text{O}_2^-$), hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal peroksil ($\text{ROO}\bullet$) merupakan beberapa contoh *reactive oxygen species* (ROS) (Murray *et al.*, 2009). *Reactive oxygen species* dibentuk selama metabolisme seluler dan aktivitas fisiologis, dan memiliki peranan penting dalam *cell signalling*, apoptosis, ekspresi gen dan transportasi ion (Lu *et al.*, 2010). Namun jika ROS dalam jumlah yang banyak dapat memiliki efek merusak pada banyak molekul biologis seperti DNA, protein, karbohidrat dan lipid (Lobo *et al.*, 2010). *Reactive Oxygen*

Species dapat menyerang di asam nukleat, amino rantai samping asam protein dan ikatan ganda dalam asam lemak tak jenuh, di mana $\bullet\text{OH}$ adalah oksidan terkuat (Lu *et al.*, 2010). Kerusakan ini akan mengubah struktur dan fungsi sel sehingga dapat mengganggu kinerja organ secara umum (Winarsi, 2007).

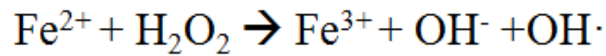


Gambar 2.1 Jenis dan sumber ROS dan titik aksi antioksidan (Sumber: Lu *et al.*, 2010)

2.2 Radikal Hidroksil

Radikal Hidroksil ($\bullet\text{OH}$) merupakan salah satu ROS yang sangat reaktif, lebih toksik dibandingkan dengan radikal lain dan dapat bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid, dan molekul lain untuk mengubah struktur molekul-molekul tersebut dan menyebabkan kerusakan jaringan (Murray *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2010). Menurut Travers dan Buckle (2000), radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) paling sering berasal dari reaksi fenton, dimana Fe(II) mereduksi H_2O_2 sehingga elektron diberikan kepada radikal hidroksil.

Murray *et al.* (2009) menyatakan $\text{O}_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 adalah substrat dalam reaksi Haber-Weiss yang dikatalis oleh besi, yang juga dapat menghasilkan $\bullet\text{OH}$ dan OH^- . Superoksida dapat membebaskan ion besi dari feritin. Karena itu, pembentukan $\bullet\text{OH}$ mungkin adalah salah satu mekanisme yang berperan dalam cedera jaringan akibat kelebihan besi.



Gambar 2.2 Reaksi Fenton (Sumber: Murray *et al.*, 2009)



Gambar 2.3 Reaksi Haber-Weiss yang dikatalis oleh besi (Sumber: Murray *et al.*, 2009)

Radikal Hidroksil dapat bereaksi langsung dengan asam nukleat DNA dengan membentuk 8-hydroxyguanosine, senyawa yang berperan dalam kerusakan DNA. Radikal tersebut memutus salah satu untai DNA sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif DNA (Lu *et al.*, 2010). Radikal hidroksil memecah protein, terutama pada prolin dan histidin, sehingga memicu kerusakan dan degradasi prematur protein. Oleh karena itu, mencegah pembentukan radikal bebas penting untuk mencegah kerusakan komponen sel.

2.3 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan yang terjadi ketika pembentukan ROS meningkat atau kadar antioksidan berkurang (Murray *et al.*, 2009). Dalam upaya untuk mencapai keseimbangan, ROS bereaksi dengan protein, lipid, dan DNA yang dapat mengakibatkan kerusakan dan inaktivasi komponen sel.

2.3.1 Peroksidasi Lipid

Menurut Murray *et al.* (2009), peroksidasi lipid adalah suatu reaksi berantai yang menghasilkan radikal radikal bebas secara terus menerus dan peroksidasi lebih lanjut. Peroksidasi lipid yang mengandung asam lemak tidak jenuh ganda menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang merusak jaringan dan menimbulkan penyakit. Terdapat tiga proses yang terjadi selama peroksidasi lipid, yakni inisiasi, propagasi dan terminasi (Murray *et al.*, 2009). Pada peroksidasi lipid dihasilkan

beberapa senyawa (alkana, malanoaldehyde, dan isoprotanes) yang digunakan sebagai penanda dalam uji peroksidasi lipid dan telah diverifikasi di banyak penyakit seperti penyakit neurogeneratif, cedera reperfusi iskemik, dan diabetes (Lobo *et al.*, 2010).

2.3.2 Kerusakan Oksidatif Protein`

Menurut Lobo *et al.*, 2010, hasil dari kerusakan oksidatif protein dapat mempengaruhi aktivitas enzim, reseptor, dan transportasi membran yang mengarah ke penuaan. Produk ini bersifat sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan membran dan fungsi sel. Salah satu produk kerusakan oksidatif adalah radikal peroksil (ROO•).

2.3.3 Kerusakan Oksidatif DNA

Deoxyribonucleic Acid (DNA) mengandung banyak karbohidrat yang rentan terhadap senyawa radikal bebas. Oksigen yang teraktivasi oleh agen pembentuk radikal bebas dapat menginduksi lesi pada DNA. Bagian basa dan gula pada DNA teroksidasi sehingga menyebabkan degradasi dan hancurnya *single-strand* dan protein *cross-linking*.

Kerusakan *single-strand* terjadi karena bagian gula teroksidasi oleh radikal hidroksil. DNA mitokondria (mtDNA) merupakan target utama ROS. Paparan ROS pada mtDNA ditemukan pada penderita penyakit degeneratif (Winarsi, 2007). Sebagian besar kerusakan DNA dapat mengalami perbaikan. Kematian sel dan mutasi yang disebabkan oleh DNA ini terlibat dalam penyakit neurodegeneratif, penyakit kardiovaskular, kanker, dan penuaan (Lu *et al.*, 2010; Dizdaroglu, 2012).

2.4 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang cukup stabil untuk menyumbangkan elektron tunggal (H^+) ke radikal bebas sehingga tereduksi menjadi bentuk stabil (Marks *et al.*, 2000). Dalam sistem pertahanan, antioksidan memiliki peranan sebagai

pengecahan pembentukan radikal bebas, peredaman radikal, pembersihan dan adaptasi (Lobo, 2010). Molekul-molekul antioksidan dapat langsung bereaksi dengan radikal reaktif dan menghancurkan radikal tersebut. Antioksidan ini akan menjadi suatu radikal yang kurang aktif, bertahan lama, tidak berbahaya yang akan dinetralisir oleh antioksidan lain (Lu *et al.*, 2010).

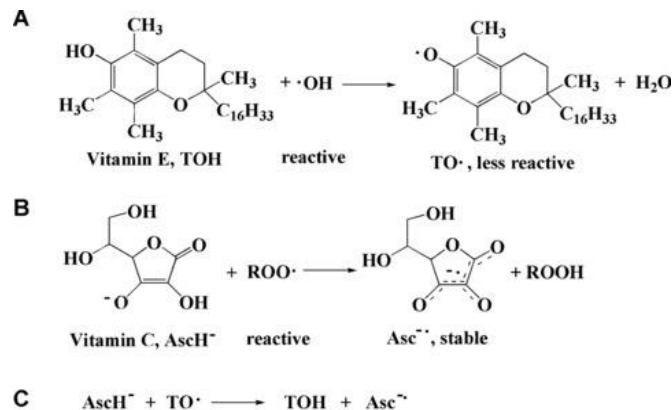
Murray *et al.* (2009) membagi antioksidan menjadi dua kelas:

- a. Antioksidan preventif yang mengurangi laju inisiasi reaksi berantai, mencakup katalase dan peroksidase lain misalnya glutathion peroksidase yang bereaksi dengan ROOH, selenium yang merupakan komponen esensial glutathion peroksidase dan mengatur aktivitasnya serta *chelator* ion logam seperti EDTA (etilendiamintetraasetat) dan DTPA (dietiltriaminopentaasetat)
- b. Antioksidan pemutus rantai yang mengganggu propagasi reaksi berantai. Antioksidan pemutus rantai yang utama adalah superoksida dismutase yang bekerja dalam fase cair untuk menangkap radikal bebas superoksida (O_2^-), urat, dan vitamin E yang bekerja dalam fase lipid untuk menangkap radikal ROO•.

Pembentukan berbagai macam antioksidan di dalam sel digunakan untuk melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif. Senyawa antioksidan yang dibentuk secara endogen dapat berupa enzim, misalnya superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase, dan senyawa non-enzimatik seperti flavonoid dan vitamin c. Selain itu, juga ditemukan beberapa bentuk antioksidan lain berupa asam amino, peptida, dan protein (Mine *et al.*, 2010).

Banyak antioksidan memiliki struktur cincin aromatik dan mampu menangkap elektron tidak berpasangan. Vitamin C ($AscH^-$) dalam fase cair dan vitamin E (TOH) dalam fase lipid akan langsung bereaksi dengan hidroksil, alkoxy dan lipid peroxy (ROO^\bullet) radikal dan membentuk H_2O , alkohol dan lipid hidroperoksida. Vitamin E itu akan menjadi fenil radikal dan vitamin C menjadi radikal yang sangat stabil ($Asc^- \bullet$). Selain itu, vitamin C juga dapat menetralkan radikal yang berasal dari antioksidan

seperti glutathione radikal dan vitamin E radikal, dan vitamin C (AscH^-) (Lu *et al.*, 2010).

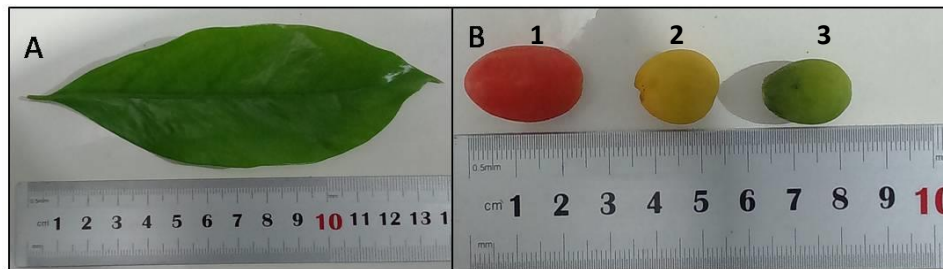


Gambar 2.4 Reaksi langsung vitamin E (TOH) dengan $\cdot\text{OH}$ (A) dan vitamin C (AscH^-) dengan $\text{ROO}\cdot$ (B) dan regenerasi vitamin E dari vitamin C (C) (Sumber : Lu *et al.*, 2010)

2.5 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Melinjo merupakan tanaman yang berasal dari Asia Tenggara seperti Myanmar, Malaysia, Filipina, Indonesia dan Papua Nugini. Berikut ini klasifikasi tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menurut *National Tropical Botanical Garden* (2015),

- Kingdom : Plantae
- Subkingdom : Tracheobionta
- Superdivisi : Spermathophyta
- Divisi : Gnetophyta
- Kelas : Gnetopsida
- Ordo : Gnetales
- Famili : Gnetaceae
- Genus : *Gnetum* L.
- Spesies : *Gnetum gnemon* L.

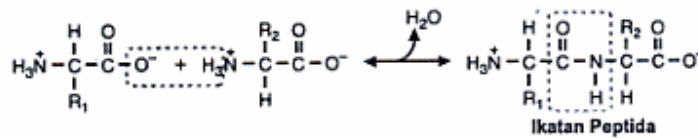


Gambar 2.5 Daun melinjo (A); Biji melinjo masak fisiologis (B 1); Biji melinjo yang belum masak (B 2,3).

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki berbagai macam manfaat. Menurut Yang *et al.* (2007) biji merupakan tempat akumulasi protein terbesar. Komposisi kandungan biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein dan 1% fenolik (Siswoyo, *et al.*, 2007). Protein dalam biji melinjo yang cukup tinggi ini berpotensi sebagai sumber antioksidan yang dapat mengikat radikal bebas dan dapat mencegah terbentuknya radikal hidroksil melalui reaksi fenton sehingga dapat melindungi kerusakan DNA (Siswoyo, 2014).

2.6 Protein

Protein tersusun dari asam amino-asam amino yang bergabung membentuk rantai linear dan mengandung molekul karbon, nitrogen, oksigen dan hidrogen (Marks *et al.*, 2000). Ikatan peptida antar dua asam amino dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Ikatan peptida antar dua asam amino (Sumber: Murray *et al.*, 2009)

Hidrolisis protein adalah proses pecahnya atau terputusnya ikatan peptida dari protein menjadi molekul yang lebih sederhana dengan menggunakan enzim proteolitik spesifik atau fermentasi yang nantinya akan disebut bioaktif peptida

(Nielsen, 2010). 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). Bioaktif peptida memiliki efek fisiologis pada kesehatan manusia (Hettiarachy *et al.*, 2012).

Menurut Erdmaan *et al.* (2008) mekanisme peptida menjadi antioksidan tidak sepenuhnya dipahami. Namun diduga hidrofobisitas dan posisi asam amino dalam peptida memiliki peran penting dalam mengetahui aktivitas antioksidan dari peptida. Asam amino ini menyumbangkan proton untuk radikal yang kekurangan elektron, dengan demikian terjadi peningkatan aktivitas penangkapan radikal (Harnedy and Fitz Gerald, 2012). Siswoyo *et al.* (2014) melaporkan, aktivitas antioksidan secara *in-vitro* dari protein hidrolisat biji melinjo menggunakan enzim alkalase mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi dalam penangkapan radikal hidroksil.

2.7 Analisis Protein

Dalam pengukuran protein secara kuantitatif, metode yang sering digunakan adalah metode Bradford. Metode ini banyak digunakan karena mudah, cepat dan memiliki sensitivitas yang tinggi (Zor & Selinger, 1996). Menurut Bradford (1976), penentuan jumlah protein, dalam mikrogram, dihitung dengan jumlah ikatan antara zat warna *Coomassie Brilliant Blue G-250* terhadap protein. Pengikatan zat warna terhadap protein ini diukur absorbansinya pada 465-595 nm. Proses pengikatan terjadi selama kurang lebih 2 menit dengan stabilitas warna yang baik selama 1 jam. Satu-satunya komponen yang dapat mempengaruhi warna dalam pengujian adalah deterjen seperti natrium dodesil sulfat dan triton X-100. Hal ini dapat dihindari dengan menggunakan kontrol yang tepat (Bradford, 1976).

2.8 Pemurnian Protein

Untuk meneliti sifat fisik dan fungsional suatu protein secara rinci, diperlukan protein yang sangat murni. Pemisahan ini didasarkan pada perbedaan kelarutan relatif

masing-masing protein sebagai fungsi pH (pengendapan isoelektrik), polaritas (pengendapan dengan etanol atau aseton), atau konsentrasi garam (penggaraman dengan amonium sulfat) (Murray, 2009).

2.8.1 Kromatografi Cair dengan Metode Gel Filtrasi

Pemisahan kromatografik merupakan salah satu cara memisahkan molekul protein. Gel filtrasi merupakan salah satu metode kromatografi cair dengan cara membagi molekul berdasarkan perbedaan ukuran molekulnya (Stanton, 2004). Prinsip dasar gel filtrasi yaitu dibagi menjadi fase gerak dan fase diam (O'Fagain *et al.*, 2011).

Fast protein liquid chromatography (FPLC) merupakan sistem kromatografi cair yang dirancang untuk pemurnian protein (Madadlou *et al.*, 2011). Pemisahan protein dilakukan dibawah tekanan atmosfer di kolom vertikal. Perbedaan FPLC dengan HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) terletak pada laju aliran dan tekanan yang digunakan, ukuran bahan yang digunakan dan resolusi yang dicapai. Secara umum FPLC digunakan untuk skala besar (Doran, 2013).

Pemisahan adalah pengikatan protein terlarut kedalam media kromatografi. Setelah itu, protein yang tidak terikat dicuci dengan urea yang mengandung eluent bufer A. Pemisahan protein dilakukan dengan elusi gradien. Protein dielusi berdasarkan efektifitasnya terhadap larutan buffer (Madadlou *et al.*, 2011).

2.8.2 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi protein selama pemurnian dan untuk menilai homogenitas fraksi yang telah dimurnikan (Deutscher, 1990). Elektroforesis memisahkan biomolekul-biomolekul bermuatan berdasarkan laju migrasi dalam medan listrik dan dijalankan secara vertikal. Pada SDS-PAGE, akrilamid mengalami polimerisasi dan pengikatan-silang untuk menghasilkan matriks

berpori. SDS mendenaturasi dan mengikat protein dengan perbandingan satu molekul SDS per dua ikatan peptida (Murray, 2009).

Polipeptida-polipeptida ini akan terpisah berdasarkan massa molekul relatif polipeptida tersebut. Setiap polipeptida yang terperangkap dalam gel akrilamid divisualisasikan dengan pulasan zat pewarna seperti *coomassie blue* (c) (Murray, 2009). Molekul pada SDS polypeptida berpindah berdasarkan massa molekulnya, molekul yang bermassa kecil akan lebih cepat berpindah di dalam gel dan akan membentuk suatu pita tunggal dalam gel yang merupakan kriteria pemurnian dengan berat molekul tertentu (Deutscher, 1990).

2.8.3 Elektroforesis Gel *Agarose*

Elektroforesis gel *agarose* dapat digunakan secara efektif untuk deteksi dan karakterisasi plasmid *deoxyribonucleic acid* (DNA) (Meyers *et al.*, 1976). Metode pemisahan molekul DNA ini didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga matriks stabil di bawah pengaruh medan listrik dalam media gel *agarose*. Elektroforesis gel *agarose* digunakan untuk memisahkan fragmen DNA dan menentukan urutan DNA (*sekuensing*) yang berukuran lebih besar dari 100 pb dan dijalankan secara horizontal. Gel *agarose* merupakan fase diam dalam pemisahan fragmen DNA dan muatan listrik sebagai fase geraknya.

Pewarna *etidium bromide* digunakan untuk mengamati lokasi fragmen DNA yang terbentuk seperti pita-pita pada elektroforesis. Perpindahan DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA dan ditentukan oleh ukuran panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya (Susanto, 2012). Proteksi terhadap kerusakan DNA dianalisis melalui elektroforesis gel *agarose* 1%. Proteksi terhadap kerusakan DNA dianalisis dengan pencegahan perubahan morfologi SC (*super coiled*) plasmid DNA menjadi OC (*open circular*) plasmid DNA yang diinisiasi ROS dari reagen fenton.

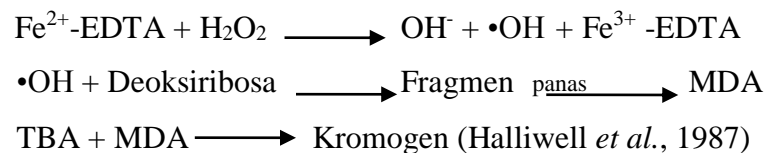
2.9 Penentuan Aktivitas Antioksidan

2.9.1 Uji Peredaman ABTS

Uji peredaman ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate)) didasarkan pada penghambatan antioksidan terhadap absorbansi radikal kation 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) (Moreno, 2002). ABTS dapat menentukan aktivitas antioksidan dari kompleks sampel hidrofilik (media buffer) dan lipofilik (media organik). Metode ini membutuhkan waktu reaksi yang lebih sedikit, lebih stabil dalam buffer, lebih sensitif, dan dapat diamati dalam rentang pH luas yang mempunyai absorbansi spesifik pada panjang gelombang region *visible* (Arnao, 2000). Sampel yang diuji ABTS diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 734 nm (Moreno, 2002).

2.9.2 Uji Peredaman Radikal Hidroksil

Radikal hidroksil merupakan salah satu jenis ROS yang dapat bereaksi dengan asam amino, DNA, dan komponen membran, sehingga menyebabkan peroksidasi lipid dan kerusakan biologis yang sangat besar. Uji peredaman radikal hidroksil ini dikenal sebagai salah satu metode yang paling berguna untuk menentukan kemampuan antioksidan untuk mengurangi tingkat pro-oksidan seperti hidrogen peroksida. Uji radikal hidroksil menunjukkan kemampuan antioksidan menghambat degradasi deoksiribosa yang dimediasi oleh radikal hidroksil dalam reaksi Fenton (Je & Ahn, 2011; Moreno, 2002).

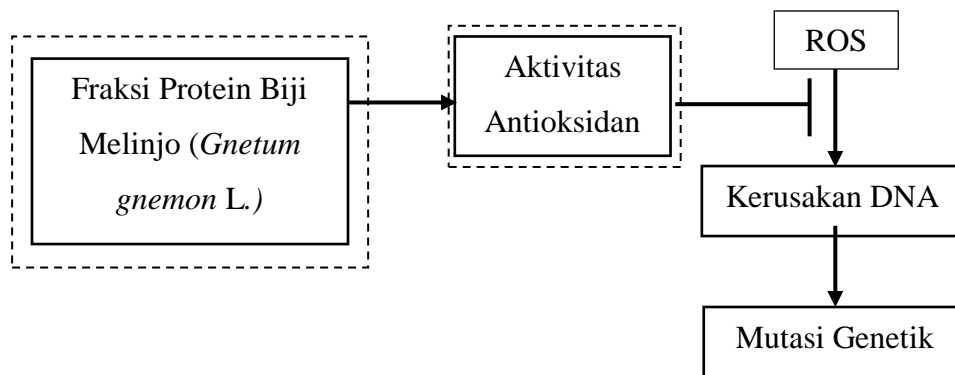


2.9.3 Uji Peredaman Hidrogen Peroksida (*Hidrogen Peroxide Scavenging Activity*)

Hidrogen peroksida tidak terlalu reaktif tetapi dapat menjadi racun bagi sel karena dapat berubah menjadi radikal hidroksil yang lebih reaktif di dalam sel (Keser

et al., 2012). Hidrogen peroksida dapat menembus membran biologis dan menginduksi degradasi oksidatif makromolekul biologis seperti lipid, protein atau enzim, karbohidrat dan asam nukleat, melalui generasi radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$) yang merupakan spesies ROS yang paling reaktif. Pengukuran uji peredaman hidrogen peroksida dapat dilakukan dengan mudah dan sensitif menggunakan sistem uji berbasis peroksidase (Moreno, 2002; Je *et al.*, 2009). Peredaman hidrogen peroksida oleh antioksidan dapat dikaitkan dengan kemampuan antioksidan untuk menyumbangkan elektronnya (Je *et al.*, 2009).

2.10 Kerangka Konseptual



Gambar 2.7 Kerangka konseptual penelitian

Keterangan:

- : Permasalahan
- : Variabel yang diteliti
- : Supresi

Radikal bebas memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) sehingga menimbulkan stress oksidatif. Untuk mencapai keseimbangan, ROS bereaksi dengan DNA sehingga dapat mengakibatkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA yang terus menerus dan tidak dapat diperbaiki akan menyebabkan terjadinya mutasi genetik. Protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) memiliki kandungan antioksidan yang

diharapkan mampu mengikat radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan DNA.

2.11 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan tinjauan pustaka, hipotesis dalam penelitian ini sebagai berikut:

- a. Terdapat fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis yang memiliki potensi paling kuat dalam meredam radikal hidroksil.
- b. Fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih memiliki pengaruh dalam uji peredaman radikal hidroksil.
- c. Fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih memiliki pengaruh dalam uji peredaman hidrogen peroksida.
- d. Fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terpilih memiliki kemampuan proteksi terhadap kerusakan DNA.

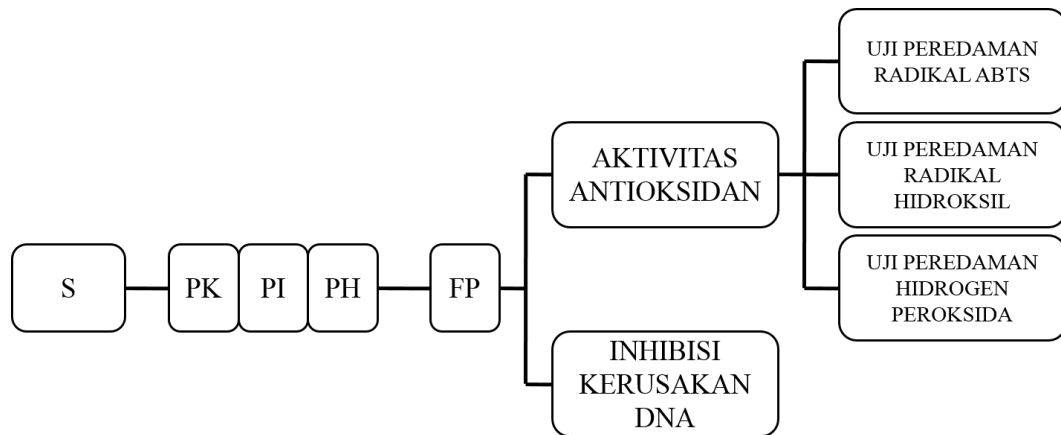
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menemukan hubungan sebab akibat.

3.2 Rancangan Penelitian

Secara skematis rancangan penelitian digambarkan sebagai berikut:



Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian

Keterangan :

- S : Sampel biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- PK : Protein kasar biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- PI : Protein isolat biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- PH : Protein hidrolisis biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- FP : Fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.)
- ABTS : Pengujian aktivitas peredaman radikal ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*)

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang sudah masak fisiologis, ditandai dengan warna kulit luar merah tua.

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember. Waktu Penelitian pada bulan September 2015 – Desember 2015.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sentrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), stirer, inkubator (Carbolite), *microplate reader* (spektrofotometer Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), *fast protein liquid chromatography* (FPLC), *gel electrophoresis*, *Gel Doc* UV transilluminator, *dry block heater*, *microplate*, Kit Gene All SV *Coloum type T*, tabung reaksi, *siringe* Hamilton dan alat pendukung penelitian lainnya.

3.5.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Biji Melinjo, aquadest, Buffer fosfat 0,1 M pH 7,55, HCl 5 M, NaOH 1 M, 0,1% *trinitro-benzene-sulfonic acid* (TNBS), reagen Bradford, *ethylene diamine tetra acid* (EDTA) (*pure*) 1 mM, FeCl₃ 10 mM, H₂O₂ 10 mM, *deoxyribose* 10 mM, buffer fosfat 50 mM pH 7,4, Asam Ascorbat, *tiobarbituric acid* (TBA) 0,05%, *trichloroacetic acid* (TCA) 10%, *alcalase*, plasmid DNA *pBluescript*, media cair Luria Bertani, antibiotik *ampicillin*, ddH₂O, *agarose* gel 1%, 7 mM ABTS (*2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)*) solution, 2,45 mM potassium persulfate, 0,2 M fosfat buffer salin, dan bahan pendukung lainnya.

3.6 Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi sampel uji fraksi protein 3 biji melinjo (Gg-FP3) (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil persen (%) peredaman radikal bebas, serta pita SC (*supercoiled*) dan OC (*open circular*) pada elektroforesis gel *agarose* 1% terhadap sampel uji.

3.6.3 Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah waktu inkubasi, suhu dan waktu sterilisasi, cara transluminasi gel, cara ekstraksi sampel, dan prosedur kerja penelitian.

3.7 Definisi Operasional

1. Sampel biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) berasal dari biji melinjo yang sudah masak secara fisiologis, ditandai dengan warna kulit luar merah tua.
2. Protein kasar (Gg-PK) merupakan ekstraksi protein yang diperoleh dari biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang telah dihaluskan, lalu dipisahkan antara pelet dan supernatan. Supernatan protein biji melinjo ini yang disebut protein kasar (Gg-PK). Total jumlah protein Gg-PK diukur menggunakan metode Bradford.
3. Protein isolat (Gg-PI) merupakan ekstraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang kemudian dilakukan pengisolasian protein dengan metode *isoelectric presipitation*. Penentuan kadar protein menggunakan metode Bradford.
4. Protein terhidrolisis (Gg-PH) merupakan isolasi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang dilarutkan dengan aquades, kemudian protein ini dicerna

menggunakan enzim alcalase dan dilakukan pengisolasian protein. Tujuan dari proses ini adalah untuk menghasilkan protein dengan berat molekul yang lebih kecil. Penentuan kadar protein menggunakan metode Bradford. Penentuan derajat hidrolisis menggunakan metode TNBS.

5. Fraksi protein (Gg-FP) merupakan pemurnian protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis menggunakan sistem kromatografi cair dengan metode gel filtrasi. Setiap fraksi yang menunjukkan adanya puncak protein ditampung lalu ditentukan kadar protein dan diuji aktivitas antioksidan.
6. Uji peredaman radikal hidroksil diukur dari penghambatan degradasi deoksiribosa oleh radikal bebas yang berasal dari reaksi Fenton. Kerusakan deoksiribosa yang berasal dari radikal bebas diukur dengan menggunakan tes *thiobarbituric acid*. Penghitungan besar absorbansi dari hasil reaksi menggunakan spektrofotometer pada λ 532 nm.
7. Uji hidrogen peroksida menggunakan ABTS sebagai kromogen. Uji ini berdasarkan kemampuan H_2O_2 untuk menyumbangkan elektron. Penghitungan besar absorbansi dari hasil reaksi menggunakan spektrofotometer pada λ 405 nm menggunakan *microplate reader*.
8. Uji peredaman radikal ABTS menggunakan senyawa *2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)* sebagai sumber penghasil radikal bebas. Sampel yang ditambahkan pada uji ini diukur pengaruh penghambatannya terhadap efek radikal bebas. Penghitungan besar absorbansi dari hasil reaksi menggunakan spektrofotometer pada λ 732 nm.
9. Elektroforesis gel *agarose* 1% adalah metode pemisahan molekul DNA yang didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga matriks stabil karena pengaruh medan listrik dalam media gel *agarose*. Kerusakan DNA diindikasikan dengan konversi SC plasmid DNA menjadi OC plasmid DNA.

3.8 Prosedur Penelitian

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

Proses ekstraksi biji melinjo berdasarkan Siswoyo (2014), bahan baku yang digunakan adalah biji melinjo masak secara fisiologis ditandai dengan kulit luar berwarna merah penuh. Kulit biji melinjo dibuang dan biji dibersihkan dari lapisan kedua secara manual. Biji lalu dihancurkan dengan menggunakan blender kemudian disaring dan dilarutkan dalam aquadest dengan perbandingan volum biji:volum aquadest adalah 1:3. Selanjutnya larutan tersebut dimasukkan ke dalam tube dan disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15 °C. Supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar biji melinjo (Gg-PK).

3.8.2 Isolasi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Berdasarkan Siswoyo (2014), supernatan hasil sentrifugasi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) diambil dan peletnya dibuang. Pengisolasian protein ini menggunakan metode *isoelektric presipitation*. Supernatan kemudian ditambahkan 1 M HCl sampai pHnya menjadi 4. Pada pH ini sebagian besar protein akan mengendap di titik isoelektriknya. Kemudian suspensi dibiarkan selama 30 menit untuk memungkinkan protein dapat terendapkan secara sempurna. Larutan kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 15 °C untuk memisahkan protein berupa endapan dan cairan sisa yang mengandung bahan-bahan terlarut seperti gula, mineral, dan sebagainya. Supernatan hasil sentrifugasi protein ini dibuang kemudian endapan protein dilarutkan dengan air distilat dan diatur pHnya sampai 8 dengan menggunakan 1 N NaOH. Hasil dari isolasi protein ini disebut sebagai protein isolat biji melinjo (Gg-PI).

3.8.3 Ekstraksi Protein Terhidrolisis Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Protein isolate dihidrolisis berdasarkan metode Siswoyo (2014). Setelah didapatkan Gg-PI, protein diukur kadar proteinnya menggunakan metode Bradford

lalu dihidrolisis menggunakan enzim *alcalase*. Protein isolat biji melinjo ditambahkan *alcalase* sebanyak 20 μL 10 kali pengenceran, lalu diinkubasi 50°C menggunakan *waterbath* selama 10 jam. Setelah 10 jam, enzim *alcalase* dihentikan kerjanya dengan cara dipanaskan selama 10 menit pada suhu 95 °C. Protein ini kemudian di sentrifuse 10000 rpm selama 10 menit dalam suhu 15 °C. Pelet hasil sentrifugasi dibuang dan supernatan disimpan. Supernatan ini yang kemudian akan dianalisis sebagai protein terhidrolisis biji melinjo (Gg-PH).

3.8.4 Fraksinasi Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Peptida antioksidan dimurnikan dari hidrolisat enzimatik menggunakan *fast protein liquid chromatography* (FPLC). Hidrolisat sebanyak 500 μL dimasukkan ke dalam FPLC dengan pemisahan laju alir 1 mL/2 menit dalam 50 mM bufer Na-Phospat pH 7. Setiap fraksi dipantau pada 280 nm, dikumpulkan pada volume 7 mL.

3.8.5 Penentuan Total Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan metode Bradford (1976). Sampel protein sebanyak 5 μL ditambahkan dengan 45 μL aquadest dan ditambah dengan 950 μL larutan Bradford. Sampel kemudian divortex dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 595 nm. Hasil yang didapat dibandingkan dengan Standar Bovine Serum Albumin (BSA) untuk mengetahui kandungan protein terlarut.

3.8.6 Pengukuran Derajat Hidrolisis

Pengukuran derajat hidrolisis ditentukan dengan menggunakan metode TNBS berdasarkan reaksi antara amino *group* dengan *trinitro-benzene-sulfonic acid* (TNBS) reagen (Adler-Nissen, 1979). Untuk pengukuran hidrolisis, Sampel 0,25 mL dicampur dengan 2 mL 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 2 mL 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada 50 °C. Hasil pengukuran dibaca absorbansinya pada λ 420 nm. Larutan 1,5 mM L-leucine digunakan sebagai standart pada pengukuran ini.

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.

3.8.7 Uji Peredaman Radikal ABTS

Berdasarkan You *et al.* (2002), reagen ABTS dibuat dengan mencampurkan 7 mM ABTS dan 2,45 mM *potassium per sulfate* dengan jumlah sebanding yang kemudian diinkubasi selama 12-16 jam di tempat gelap pada suhu ruang. Sebelum memulai pengujian, reagen ABTS dilarutkan dengan 0,2 M *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4 hingga besar absorbansi $0,70 \pm 0,02$ pada λ 734 nm. Sampel untuk uji peredaman ABTS radikal dengan konsentrasi 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Kontrol dibuat dengan cara sama tanpa penambahan sampel. Campuran sampel dan reagen ABTS dihomogenkan menggunakan vortex selama 30 detik dan diinkubasi pada ruang gelap selama 6 menit. Uji peredaman ABTS radikal dinyatakan sebagai % penghambatan terhadap radikal ABTS. Persen penghitungan dihitung sesuai rumus:

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

Dimana $A_{control}$ merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (blank) dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*.

3.8.8 Pengujian Peredaman Radikal Hidroksil (*Hydroxyl Radical Scavenging Activity*)

Pengujian peredaman radikal hidroksil (*Hydroxyl radical scavenging activity*) sesuai dengan metode Halliwell dan Gutteridge (1987) dalam Kumar *et al.*, 2013 dengan perubahan. Pada tabung reaksi tertutup, masukkan 36 μL 10 mM deoksiribosa dan 100 μL sampel protein dengan konsentrasi 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dan 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Kemudian pada masing-masing tabung tambahkan FeCl_3 1 μL 10 mM, *ethylene diamine tetra acid* (EDTA) 10 μL 1 mM, H_2O_2 10 μL 10 mM, buffer fosfat

33 μL 50 mM pH7,4; dan asam 10 μL 0,1 mM sehingga total volume akhir 200 μL . Inkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Tambahkan 25 μL *trichloroasetic acid* (TCA) 10% dan 25 μL *thiobarbituric acid* (TBA) untuk memunculkan warna kromogen pink. Tabung reaksi berisi sampel kemudian dipanaskan pada 80 °C selama 30 menit. Kemudian didinginkan dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang λ 532 nm. Untuk kontrol dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan sampel. Faktor koreksi dibuat dengan cara yang sama tanpa penambahan TBA. Aktivitas peredaman hidroksil radikal ($\bullet\text{OH}$) dinyatakan sebagai % penghambatan terhadap radikal hidroksil dan IC_{50} ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Persen penghitungan dihitung sesuai rumus:

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

Dimana A_{control} merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (blank) dan A_{sampel} adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel. Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan algoritma regresi nonlinear dari besar persen *scavenging*.

3.8.9 Pengujian Peredaman Hidrogen Peroksida (*Hidrogen Peroxide Scavenging Activity*)

Pengujian peredaman hidrogen peroksida menggunakan metode Muller (1985) dalam Je *et al.* (2009). Sebanyak 100 μl bufer fosfat pH5,0 dicampur dengan protein hidrolisis dalam 96-*microwell plate*. Kemudian 20 μL hidrogen peroksida 10 mM ditambahkan lalu dicampur, dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Setelah inkubasi, 30 μl ABTS 1,25 mM dan 30 μl peroksidase (1 unit/mL) ditambahkan dan dicampur, dilanjutkan inkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 5 menit. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 405 nm menggunakan *microplate reader*.

3.8.10 Analisis Pola Pita Protein dengan 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. Memasukkan *plate* yang sudah berisi gel ke dalam *chamber* elektroforesis. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah gel terendam

Sampel buffer ditambahkan ke dalam sampel protein (perbandingan 1 : 1) dalam tabung *eppendorf* kemudian dipanaskan pada suhu 95 °C selama 3 menit. Sampel dengan kandungan protein 10 µg dimasukkan ke dalam sumur gel menggunakan *syringe* Hamilton, kemudian *dirunning* pada arus konstan 20 mA 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 pada kecepatan 36 rpm selama 24 jam. Setelah itu, larutan staining dituang kembali pada wadahnya kemudian dicuci dengan aquadest. Gel direndam dalam larutan destaining dengan kecepatan 36 rpm selama 3 jam 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.

3.8.11 Kultur dan isolasi plasmid DNA

Plasmid DNA yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah plasmid DNA *pBluescript*. Dalam 2 mL media LB cair di tabung kultur tertutup yang telah disterilkan dengan autoclave, masukkan 2 µL ampicillin sebagai antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri lain dan 10 µL plasmid DNA *pBluescript*. Inkubasi 16-21 jam dalam shaking inkubator dalam suhu ruang. Kemudian plasmid DNA diisolasi dengan kit Plasmid *Quick Method EzClear™ GeneAll* dan pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan *nanodrop Nano Vue*.

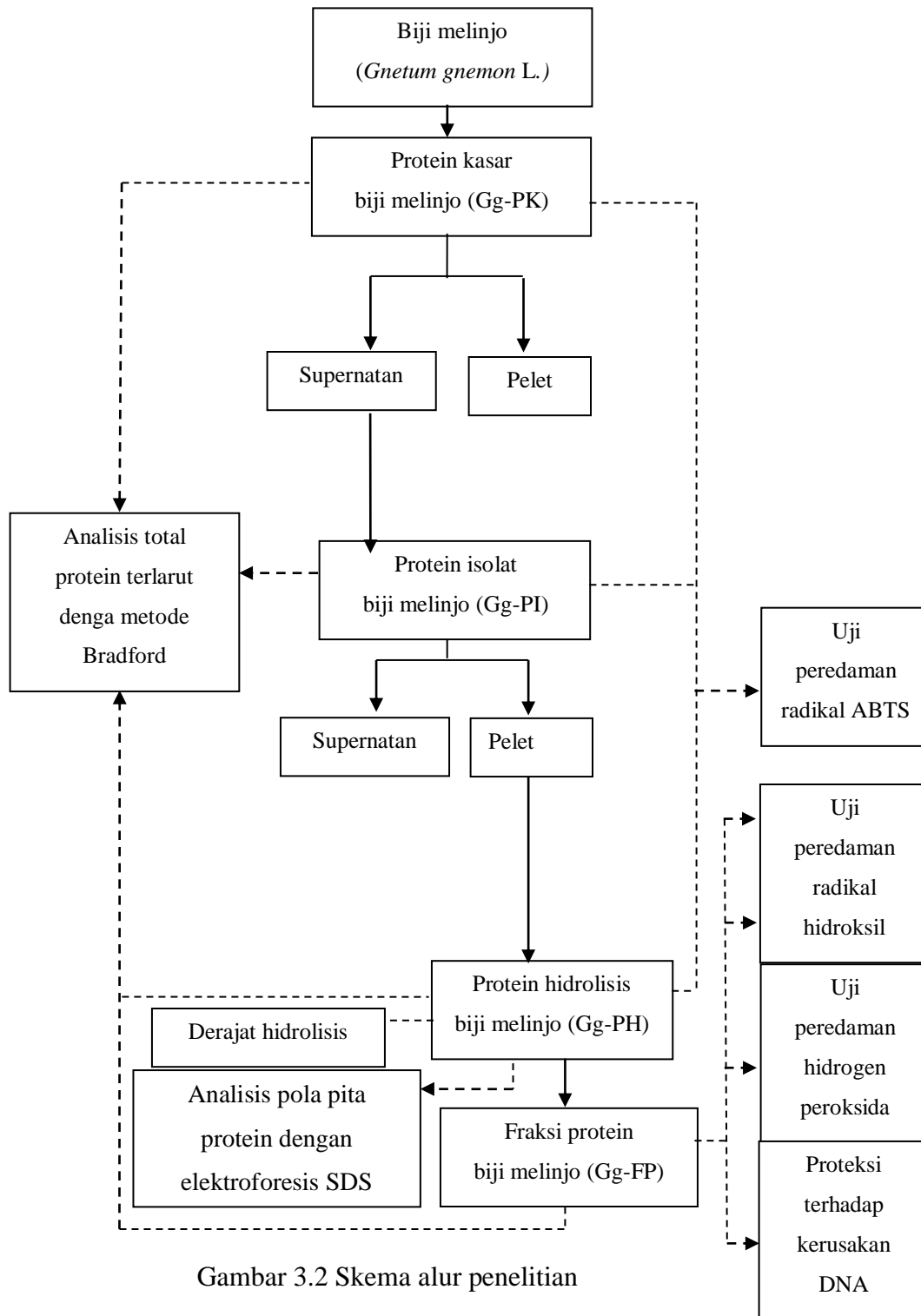
3.8.12 Proteksi terhadap Kerusakan DNA melalui Elektroforesis Gel *Agarose* 1%

Elektroforesis gel *agarose* 1% untuk mengetahui efek proteksi ekstrak protein biji melinjo (*Gnetum genmon* L.) terhadap kerusakan DNA yang diinduksi radikal hidroksil dari reaksi fenton sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh Arnao (2000). Pada tabung ependrorf, masukkan 0,5 µg plasmid DNA *pBluescript* dengan campuran larutan 30 mM H₂O₂, 50 µM asam ascorbat, dan 80 µL FeCl₃. Tambahkan 15 µg sampel ekstrak protein isolat dan tambahkan *deionized* aquadest steril sampai volume akhir 20 µL. Kontrol (+) merupakan plasmid DNA murni tanpa tambahan reaksi fenton. Plasmid dan *fenton reaction* juga ditambahkan sebagai pembanding berdasarkan waktu 5 menit, 10 menit, dan 15 menit. Semua sampel kemudian diinkubasikan selama 15 menit pada 37 °C. Preparasi sampel sebelum dirunningkan dalam sumur gel *agarose* 1% dilakukan dengan menambahkan loading buffer dengan perbandingan 1 : 4. Jumlah maksimal sampel yang dapat dimasukkan dalam setiap sumur gel adalah 10 µL. Gel *agarose* dengan pewarnaan etidium bromide dirunningkan dalam buffer TBE dengan tegangan 50V selama ±60 menit sampai terbentuk pita. Setelah elektroforesis selesai, pengamatan pita dilakukan dengan transluminasi UV *Gel Doc* untuk mendeteksi bagian *super coiled* (SC) / *covalently closed circular* (CCC) plasmid DNA, *open circular* (OC) plasmid DNA, dan *linear* plasmid DNA.

3.9 Analisis Data

Analisis data regresi linear menggunakan Microsoft Excel 2013 untuk mengetahui hubungan pengaruh fraksi protein biji melinjo (*Gnetum gnemon* L.) terhidrolisis terhadap penghambatan radikal bebas dan menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ digunakan untuk menunjukkan seberapa besar konsentrasi protein yang dibutuhkan untuk meredam radikal bebas sebanyak 50%.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema alur penelitian