



**HIDROLISIS PROTEIN ISOLAT BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
MENGUNAKAN ALKALASE TERIMOBILISASI DAN
AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIHIPERTENSI**

SKRIPSI

Oleh

**Nur Fauziah Matra
NIM 122210101023**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**HIDROLISIS PROTEIN ISOLAT BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon L.*)
MENGUNAKAN ALKALASE TERIMOBILISASI DAN AKTIVITASNYA
SEBAGAI ANTIHIPERTENSI**

SKRIPSI

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

Oleh

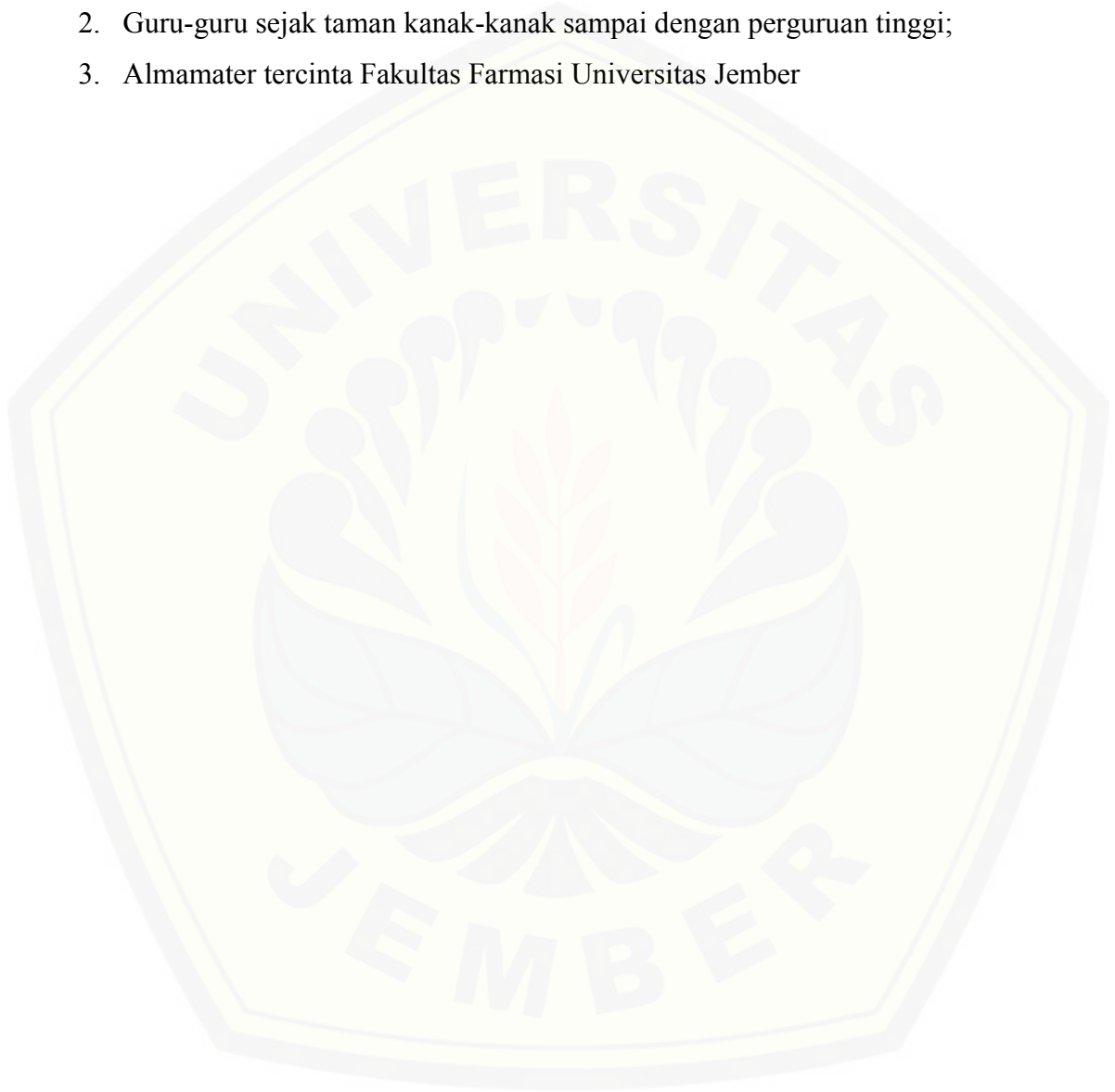
**Nur Fauziah Matra
NIM 122210101023**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

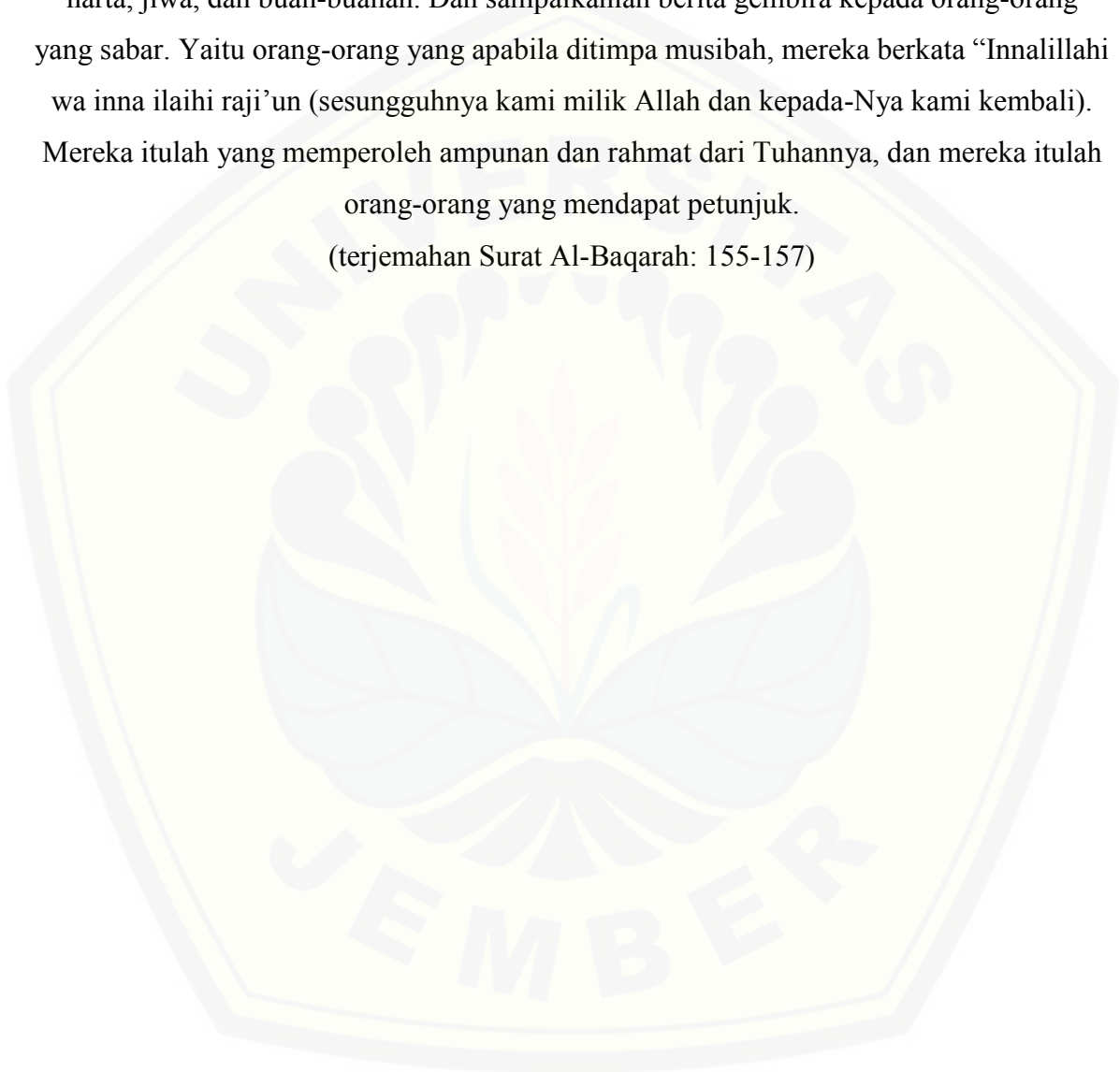
1. Ibunda Suhairiyah dan Ayahanda Hamsyah La Matra;
2. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
3. Almamater tercinta Fakultas Farmasi Universitas Jember



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 Tuhannya, dan mereka itulah orang-orang yang mendapat petunjuk.

(terjemahan Surat Al-Baqarah: 155-157)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nur Fauziah Matra

NIM : 122210101023

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “*Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) menggunakan Alkalase Terimobilisasi dan Aktivasinya sebagai Antihipertensi*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan isinya sesuai dengan prinsip ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 23 Agustus 2016

Yang menyatakan,

Nur Fauziah Matra

NIM 122210101023

SKRIPSI

**HIDROLISIS PROTEIN ISOLAT BIJI MELINJO (*Gnetum gnemon* L.)
MENGUNAKAN ALKALASE TERIMOBILISASI DAN AKTIVITASNYA
SEBAGAI ANTIHIPERTENSI**

Oleh

Nur Fauziah Matra
NIM 122210101023

Pembimbing

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

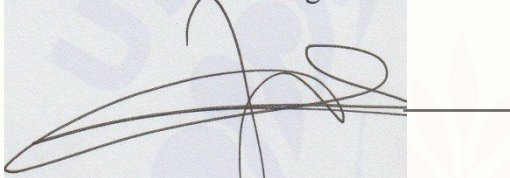
Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul "*Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo (Gnetum gnemon L.) menggunakan Alkalase Terimobilisasi dan Aktivitasnya sebagai Antihipertensi*" telah diuji dan disahkan pada:

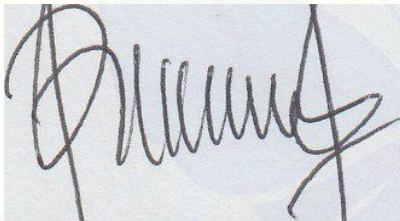
hari : Selasa
tanggal : 23 Agustus 2016
tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama



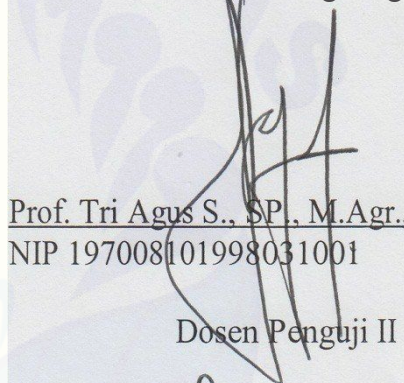
Endah Puspitasari, S. Farm., M.Sc. Apt.
NIP. 198107232006042002

Dosen Penguji I



Yuni Retnaningtyas S.Si M.Si. Apt.
NIP. 197806092005012004

Dosen Pembimbing Anggota



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

Dosen Penguji II



Ari Satia Nugraha, S.F., Ph.D., Apt.
NIP. 197807212003121001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Farmasi,
Universitas Jember



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

RINGKASAN

Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menggunakan Alkalase Terimobilisasi dan Aktivitasnya sebagai Antihipertensi; Nur Fauziah Matra, 122210101023; 2016; 59 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Hipertensi menduduki peringkat ketiga dari penyebab kematian utama di Indonesia untuk semua umur (6,8%), setelah stroke (15,4%), dan tuberkulosis (7,8%). Terapi antihipertensi yang umum digunakan adalah obat berbahan sintetik kimia yang bekerja dengan cara menghambat *angiotensin converting enzyme* (ACE). Obat berbahan sintetik kimia memiliki efek samping yang merugikan. Protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase bebas telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antihipertensi. Namun penggunaan alkalase bebas tidak ekonomis dan hanya dapat digunakan sekali saja, sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo sebagai antihipertensi. Metode imobilisasi enzim yang digunakan adalah metode penjerapan dengan DMDMOS/TMOS sebagai matriks. Karakterisasi enzim terimobilisasi diamati dengan FTIR dan efektivitas hidrolisis berulang diamati berdasarkan nilai derajat hidrolisis (DH). Keberhasilan proses hidrolisis ditentukan dengan elektroforesis SDS-PAGE. Uji aktivitas antihipertensi ditentukan dengan melihat kemampuan dalam menghambat ACE.

Hasil menunjukkan bahwa enzim alkalase telah terimobilisasi di dalam matriks silan dan profil protein SDS-PAGE menunjukkan protein biji melinjo telah berhasil dihidrolisis. Hidrolisis berulang menunjukkan enzim alkalase terimobilisasi efektif menghidrolisis protein isolat biji melinjo hingga dua kali. DH pada penggunaan pertama dan kedua berturut-turut adalah $69,48 \pm 0,026$ % dan $45,97 \pm 0,014$ %. Berdasarkan uji aktivitas *ACE-inhibitor*, diperoleh nilai IC_{50} dari protein biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase terimobilisasi (Gg-PH), protein biji melinjo yang dihidrolisis dengan alkalase bebas (Gg-PHB), dan kaptopril berturut-turut adalah $2,457 \pm 0,213$, $2,24 \pm 0,195$, dan $2,085 \pm 0,202$

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar tingkat efisiensi penghambatannya terhadap ACE. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan dari ketiga sampel tersebut (LSD, $p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antihipertensi pada Gg-PH sama dengan aktivitas antihipertensi pada kaptopril.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah swt. atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) dan Aktivasinya sebagai Antihipertensi”. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember dan dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama studi;
2. Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama, Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D. selaku dosen pembimbing anggota, Yuni Retnaningtyas, S.Si., M.Si., Apt. dan Ari Satia Nugraha, S.F., Ph.D., Apt. selaku dosen penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan ilmu serta bimbingannya;
3. Ibunda Suhairiyah dan Ayahanda Hamsyah La Matra yang telah mendidik, menyayangi, dan mendoakan saya. Kakak saya Mayank Ayu Lestari Matra, adik saya Dewi Surilani Matra dan Amy Faraldi Matra, serta seluruh keluarga besar yang turut mendoakan serta memberikan semangat;
4. Sahabat-sahabat saya Amir, Dessy, Anandini, Amelya, Nili, Ayu, Firoh, Yeni yang telah memberikan dorongan dan semangat;
5. 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, 23 Agustus 2016

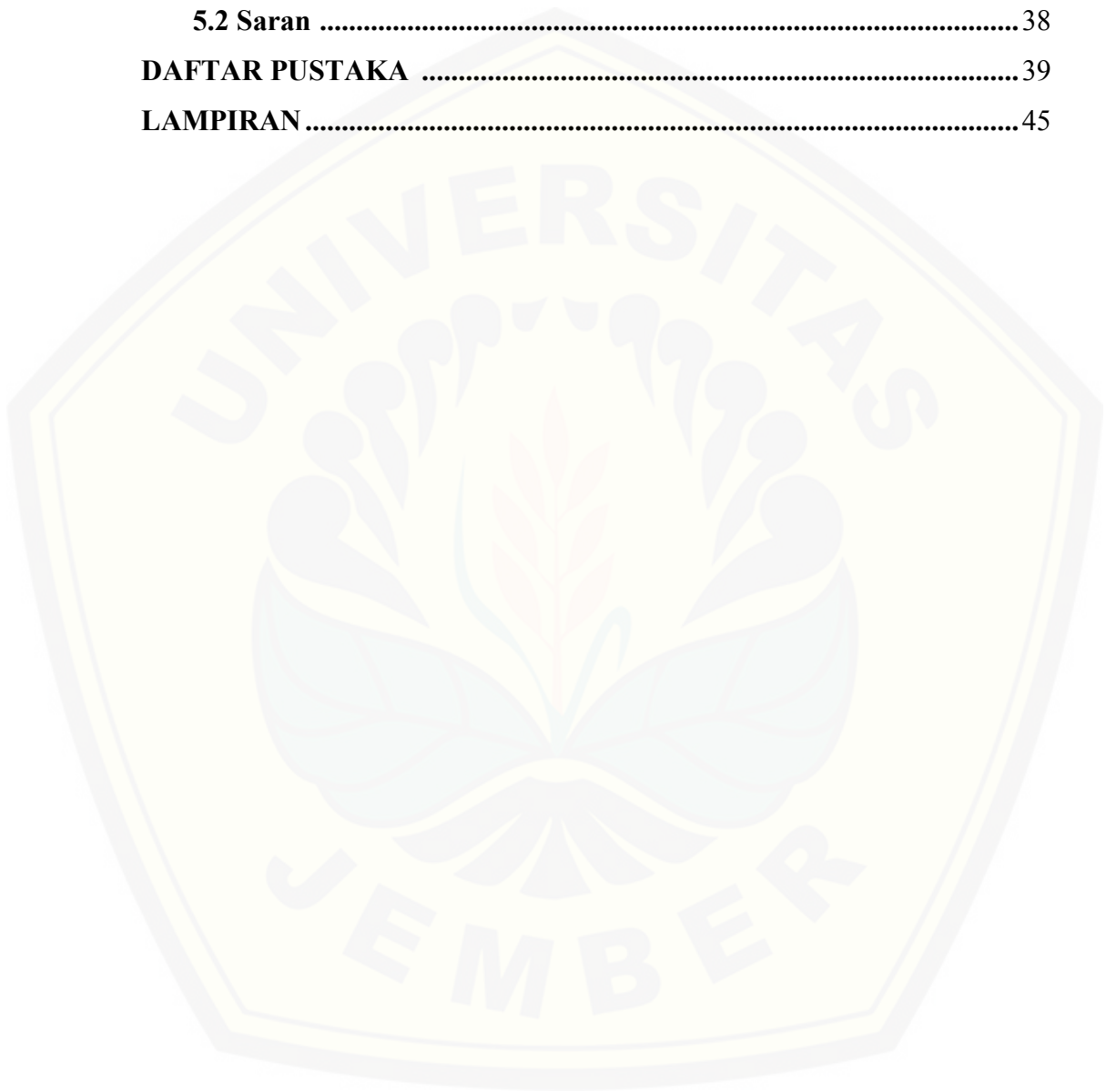
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ISTILAH	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Hipertensi	4
2.1.1 Etiologi Hipertensi	4
2.1.2 Patofisiologi Hipertensi.....	5
2.1.3 Terapi Farmakologi	6
2.2 Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i> L.).....	8
2.2.1 Taksonomi	8
2.2.2 Kandungan Gizi Melinjo.....	9

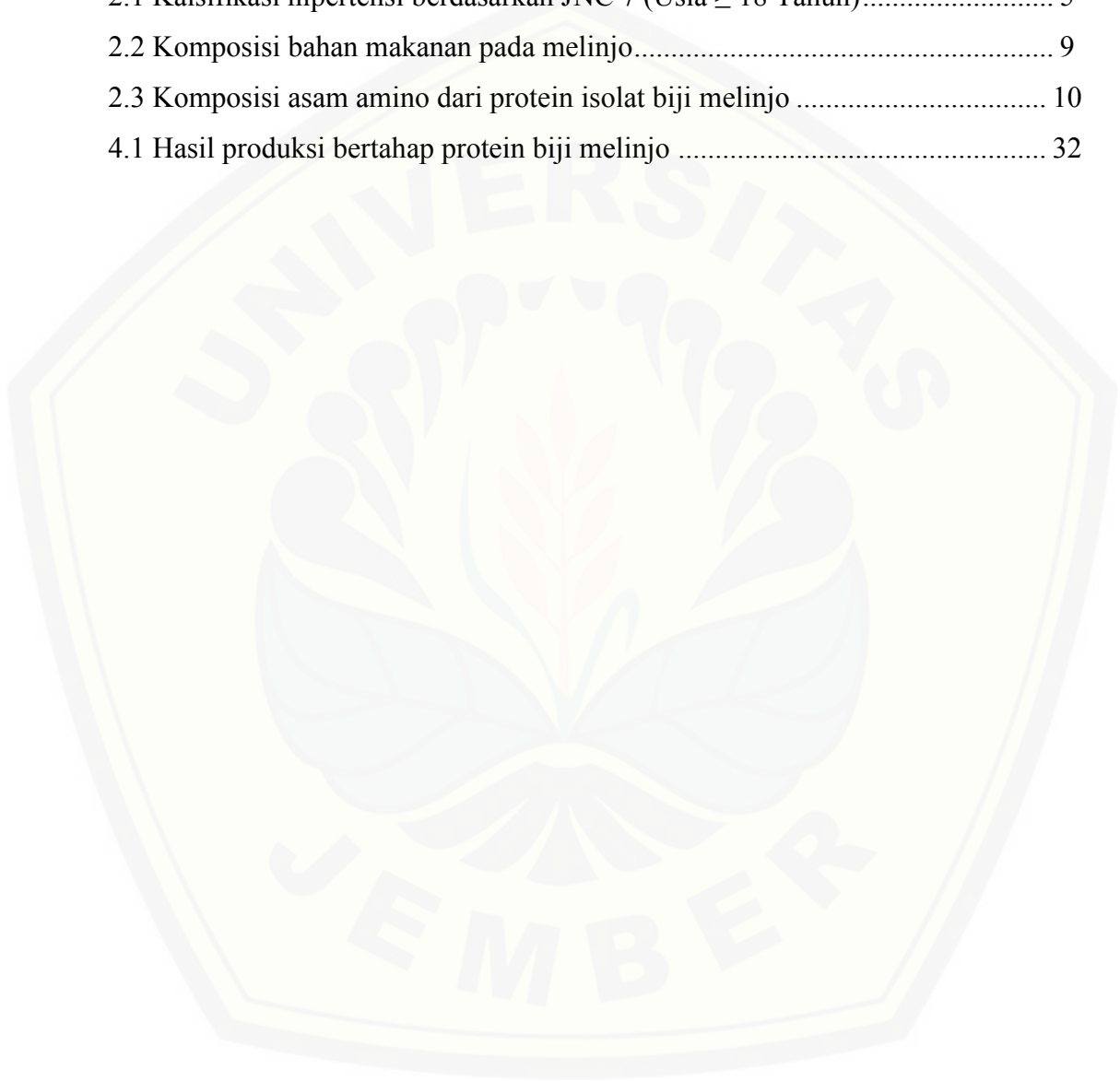
2.3 Protein	10
2.3.1 Isolasi Protein	11
2.3.2 Hidrolisis Protein	12
2.3.3 Analisis Kuantitatif Protein	14
2.3.4 Elektroforesis Gel Poliakrilamid	15
2.4 Imobilisasi Enzim	16
2.4.1 Metode Imobilisasi Enzim	16
2.5 Penentuan Aktivitas Antihipertensi	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Jenis Penelitian	21
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.3 Sampel Penelitian	21
3.4 Alat dan Bahan Penelitian	21
3.5 Rancangan Penelitian	22
3.6 Variabel Penelitian	23
3.7 Definisi Operasional	24
3.8 Prosedur Penelitian	24
3.8.1 Preparasi Imobilisasi Enzim Alkalase	24
3.8.2 Ekstraksi Biji Melinjo	24
3.8.3 Isolasi Protein Biji Melinjo	24
3.8.4 Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo	25
3.8.5 Penentuan Total Protein Terlarut	26
3.8.6 Pengukuran Derajat Hidrolisis	26
3.8.7 Elektroforesis SDS-PAGE	26
3.8.8 Uji Aktivitas Antihipertensi Protein Biji Melinjo	27
3.9 Analisis Data	27
3.10 Skema Kerja Penelitian	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Karakterisasi Imobilisasi Enzim	30
4.2 Ekstraksi dan Isolasi Protein Biji Melinjo	32
4.3 Hidrolisis Protein Biji Melinjo	33

4.4 Profil Protein Biji Melinjo	35
4.5Aktivitas Antihipertensi Gg-PH Biji Melinjo	35
BAB 5. PENUTUP	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Kalsifikasi hipertensi berdasarkan JNC 7 (Usia \geq 18 Tahun).....	5
2.2 Komposisi bahan makanan pada melinjo.....	9
2.3 Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo	10
4.1 Hasil produksi bertahap protein biji melinjo	32



DAFTAR GAMBAR

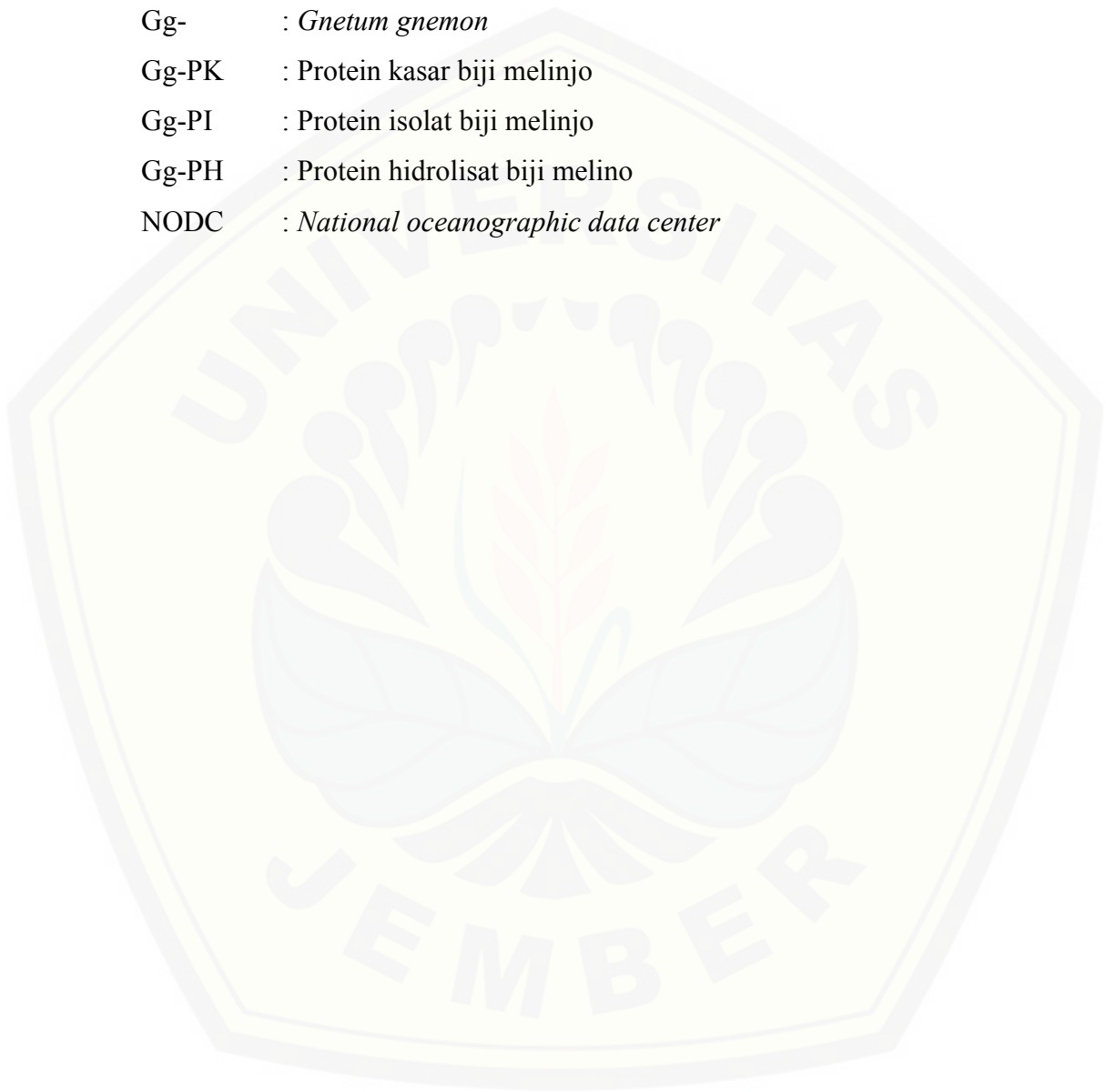
	Halaman
2.1 Patofisiologi hipertensi	7
2.2 Morfologi biji melinjo.....	8
2.3 Pembentukan ikatan peptida	10
2.4 Reaksi reagen TNBS dengan asam amino	14
2.5 Metode pengikatan enzim pada padatan pendukung	17
2.6 Metode pengikatan silang	17
2.7 Metode penjerapan.....	18
2.8 Prinsip kerja ACE- <i>inhibitor</i>	19
4.1 Spektra FTIR matriks dan enzim alkalase terimobilisasi.....	30
4.2 Pola SEM dengan perbesaran 3.000 kali	31
4.3 Persentasi derajat hidrolisis (DH) protein biji melinjo hasil optimasi	33
4.4 Persentasi derajat hidrolisis (DH) pada beberapa kali penggunaan	34
4.5 Hasil SDS-PAGE protein biji melinjo	35
4.6 Aktivitas ACE- <i>inhibitor</i> protein biji melinjo	36
4.7 Nilai IC ₅₀ aktivitas ACE- <i>inhibitor</i> Gg-PH, Gg-PHB, dan kaptopril	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Perhitungan kandungan protein biji melinjo.....	45
B. Perhitungan derajat hidrolisis	46
C. Aktivitas ACE- <i>inhibitor</i> protein biji melinjo	48
D. Analisis data statistik	50
E. Komposisi bahan yang digunakan	55
F. Pengukuran berat molekul protein.....	57
G. Dokumentasi penelitian	59

DAFTAR ISTILAH

- Gg- : *Gnetum gnemon*
Gg-PK : Protein kasar biji melinjo
Gg-PI : Protein isolat biji melinjo
Gg-PH : Protein hidrolisat biji melino
NODC : *National oceanographic data center*



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hipertensi menduduki peringkat ketiga dari penyebab kematian utama di Indonesia untuk semua umur (6,8%), setelah stroke (15,4%) dan tuberkulosis (7,8%) (Depkes RI, 2008). Hipertensi merupakan peningkatan tekanan darah sistolik lebih dari 140 mmHg dan tekanan darah diastolik lebih dari 90 mmHg pada dua kali pengukuran dengan selang waktu lima menit dalam keadaan cukup istirahat atau tenang (Depkes RI, 2014). Hipertensi dapat muncul bersamaan dengan penyakit lain (penyakit penyerta) yang tentunya dapat berpotensi memperburuk kerusakan organ. Beberapa penyebab munculnya hipertensi antara lain penyakit gagal ginjal, kelainan endokrin, asupan garam terlalu tinggi, stres, atau salah pemakaian obat (Iskandar, 2007).

Peningkatan tekanan darah dapat terjadi akibat *angiotensin converting enzyme* (ACE) di dalam sistem renin angiotensin. Sistem renin angiotensin berperan penting dalam pengaturan tekanan darah (Dipiro *et al.*, 2007). ACE akan mengubah angiotensin I menjadi angiotensin II. Angiotensin II tersebut dapat menimbulkan beberapa efek, salah satunya adalah penyempitan pembuluh darah (vasokonstriksi) (Taddei *et al.*, 2002). Hal inilah yang menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan darah (hipertensi). Sehingga, diperlukan terapi untuk mengembalikan tekanan darah tersebut. Terapi yang dapat digunakan adalah *ACE-inhibitor*. *ACE-inhibitor* bekerja dengan menghambat perubahan angiotensin I menjadi angiotensin II.

Sejauh ini, terapi antihipertensi yang banyak digunakan adalah *ACE-inhibitor* konvensional (obat yang biasa diresepkan oleh dokter kepada pasien). Terapi dengan menggunakan obat konvensional membutuhkan jangka waktu yang panjang dan dapat berlangsung seumur hidup. Penggunaan tersebut dapat menimbulkan beberapa efek samping merugikan seperti hipotensi, pusing, sakit kepala, letih, mual, diare, kram otot, nyeri perut, batuk kering, dan gangguan

ginjal (Crawford, 2006). Oleh karena itu, diperlukan alternatif dalam menangani hipertensi. Salah satunya adalah dengan ACE-*inhibitor* alami dari protein biji melinjo.

Melinjo dikenal sebagai tanaman yang dapat meningkatkan kadar asam urat dan tekanan darah apabila dikonsumsi. Namun, protein dari biji melinjo mempunyai potensi aktif sebagai antioksidan yang efektif mengikat radikal bebas penyebab berbagai macam penyakit seperti hipertensi, kolesterol tinggi, penyempitan pembuluh darah, penuaan dini, dan lain-lain (Siswoyo *et al.* 2012). Menurut Siswoyo dan Sugiharto (2012), protein isolat yang dihidrolisis dengan alkalase bebas memiliki aktivitas sebagai ACE-*inhibitor*. Hidrolisis secara enzimatis tidak mengakibatkan kerusakan asam amino seperti hidrolisis secara asam ataupun basa. Hidrolisis protein dengan menggunakan enzim alkalase memiliki perolehan protein yang paling tinggi dibandingkan dengan enzim papain dan neutrase (Hoo dan Babji, 2011). Namun, penggunaan enzim bebas dalam proses hidrolisis tidak ekonomis, selain itu hanya dapat dilakukan sekali saja. Sehingga, perlu dilakukan upaya agar enzim dapat digunakan kembali. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan imobilisasi enzim. Pada teknik imobilisasi enzim, enzim dapat digunakan secara berulang-ulang. Produk hasil reaksi dapat dengan mudah dipisahkan dan dalam beberapa kasus dapat memperbaiki aktivitas dan stabilitas enzim (Pereira, 2003). Enzim terimobilisasi juga berperan sebagai katalis dalam proses sintesis. Menurut Corici *et al.* (2011), alkalase terimobilisasi merupakan katalis yang paling baik dalam mensintesis peptida. Sejauh ini, telah banyak penelitian yang dilakukan terkait metode imobilisasi enzim, di antaranya adalah pengikatan enzim pada padatan pendukung, pengikatan silang, dan penjerapan di dalam polimer atau material sol-gel. Dari beberapa metode tersebut, metode penjerapan merupakan metode yang paling mudah dan efektif untuk teknik imobilisasi enzim (Reetz *et al.*, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antihipertensi protein hidrolisat biji melinjo dengan alkalase terimobilisasi. Aktivitas antihipertensi dapat ditentukan dengan melihat hambatan 3-hidroksibutirat (3HB) oleh protein biji melinjo yang berperan sebagai ACE-*inhibitor*. Adanya aktivitas ACE dan

aminoasilase akan memecah substrat 3HB-GGG menjadi asam amino (Gly-Gly-Gly) dan 3HB. 3HB merupakan senyawa yang akan bereaksi dengan larutan indikator dan menghasilkan larutan berwarna kuning (formazan). Semakin pudar warna yang terbentuk, maka semakin kuat aktivitas *ACE-inhibitor* (Lamet *al.*, 2008).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah

- a. Bagaimana efektivitas enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo secara berulang-ulang?
- b. Bagaimana aktivitas antihipertensi protein biji melinjo (protein isolat dan protein hidrolisat) sebagai *ACE-inhibitor*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

- a. Mengetahui efektivitas enzim alkalase terimobilisasi dalam menghidrolisis protein isolat biji melinjo secara berulang-ulang.
- b. Mengetahui aktivitas antihipertensi protein biji melinjo (protein isolat dan protein hidrolisat) sebagai *ACE-inhibitor*.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain

- a. Memberikan informasi mengenai aktivitas antihipertensi dari protein biji melinjo.
- b. Sebagai bahan acuan atau tinjauan pustaka untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hipertensi

Hipertensi atau tekanan darah tinggi adalah suatu gangguan pada pembuluh darah yang mengakibatkan suplai oksigen dan nutrisi yang dibawa oleh darah, terhambat sampai ke jaringan tubuh yang membutuhkannya. Hipertensi ditandai dengan peningkatan tekanan darah sistolik lebih dari 140 mmHg dan tekanan darah diastolik lebih dari 90 mmHg pada dua kali pengukuran dengan selang waktu lima menit dalam keadaan cukup istirahat atau tenang (Depkes RI, 2014). Faktor utama dalam mengontrol tekanan arterial ialah curah jantung dan tahanan perifer total. Bila curah jantung meningkat, tekanan darah arterial akan meningkat, kecuali jika pada waktu yang bersamaan tahanan perifer menurun. Tekanan darah akan meningkat bila salah satu faktor yang menentukan tekanan darah mengalami kenaikan (Lumbantobing, 2008).

2.1.1 Etiologi Hipertensi

Hipertensi merupakan suatu penyakit dengan kondisi medis yang beragam. Penyebab hipertensi dibagi menjadi dua golongan yaitu hipertensi primer (esensial) dan hipertensi sekunder. Hipertensi primer merupakan hipertensi yang tidak diketahui penyebabnya dan ada kemungkinan karena faktor keturunan atau genetik (90%) (Chobanian, 2004). Hipertensi primer tidak dapat disembuhkan tetapi dapat dikontrol. Beberapa mekanisme yang mungkin berkontribusi untuk terjadinya hipertensi ini telah diidentifikasi, namun belum satupun teori yang tegas menyatakan patogenesis hipertensi primer. Hipertensi sering turun temurun dalam suatu keluarga, hal ini setidaknya menunjukkan bahwa faktor genetik memegang peranan penting pada patogenesis hipertensi primer. Menurut data, bila ditemukan gambaran bentuk disregulasi tekanan darah yang monogenik dan poligenik mempunyai kecenderungan timbulnya hipertensi primer. Banyak karakteristik genetik dari gen-gen ini yang mempengaruhi keseimbangan natrium,

tetapi juga didokumentasikan adanya mutasi-mutasi genetik yang mengubah ekskresi kalikrein urin, pelepasan nitrat oksida, ekskresi aldosteron, steroid adrenal, dan angiotensinogen (Dipiro *et al.*, 2007).

Kurang dari 10% penderita hipertensi merupakan sekunder dari penyakit komorbid atau obat-obatan tertentu yang dapat meningkatkan tekanan darah. Pada kebanyakan kasus, disfungsi renal akibat penyakit ginjal kronis atau penyakit renovaskular adalah penyebab hipertensi sekunder yang paling sering (Dipiro *et al.*, 2007). Klasifikasi hipertensi dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi hipertensi berdasarkan JNC 7 (usia ≥ 18 tahun)

Kategori	Tekanan darah sistolik	Tekanan darah diastolik
	(mmHg)	(mmHg)
Normal	< 120	< 80
Prehipertensi	120 – 139	80 – 89
Hipertensi tahap 1	140 – 159	90 – 99
Hipertensi tahap 2	≥ 160	≥ 100

Sumber: Dipiro *et al.*, (2007)

2.1.2 Patofisiologi Hipertensi

Banyak faktor yang mengontrol tekanan darah yang berpotensi dalam perkembangan hipertensi primer, diantaranya adalah malfungsi sistem renin angiotensin aldosteron (RAAS), abnormalitas mekanisme neuronal, dan gangguan keseimbangan natrium, kalsium, dan hormon natriuretik (Dipiro *et al.*, 2007). Tekanan darah ditentukan oleh keseimbangan antara curah jantung dan resistensi vaskuler. Peningkatan pada salah satu faktor di atas yang tidak disertai dengan menurunnya salah satu faktor lainnya dapat menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan darah. Resistensi perifer tidak ditentukan oleh pembuluh darah arteri besar namun ditentukan oleh arteriol yang terdiri dari sel otot polos. Kontraksi sel otot polos yang terus menerus dapat menyebabkan terjadinya perubahan struktural arteriol dan penebalan dinding pembuluh darah arteriol yang diperantarai oleh angiotensin. Sehingga, dapat menyebabkan peningkatan resistensi perifer yang tidak dapat kembali (*irreversible*) (Pinto *et al.*, 2005).

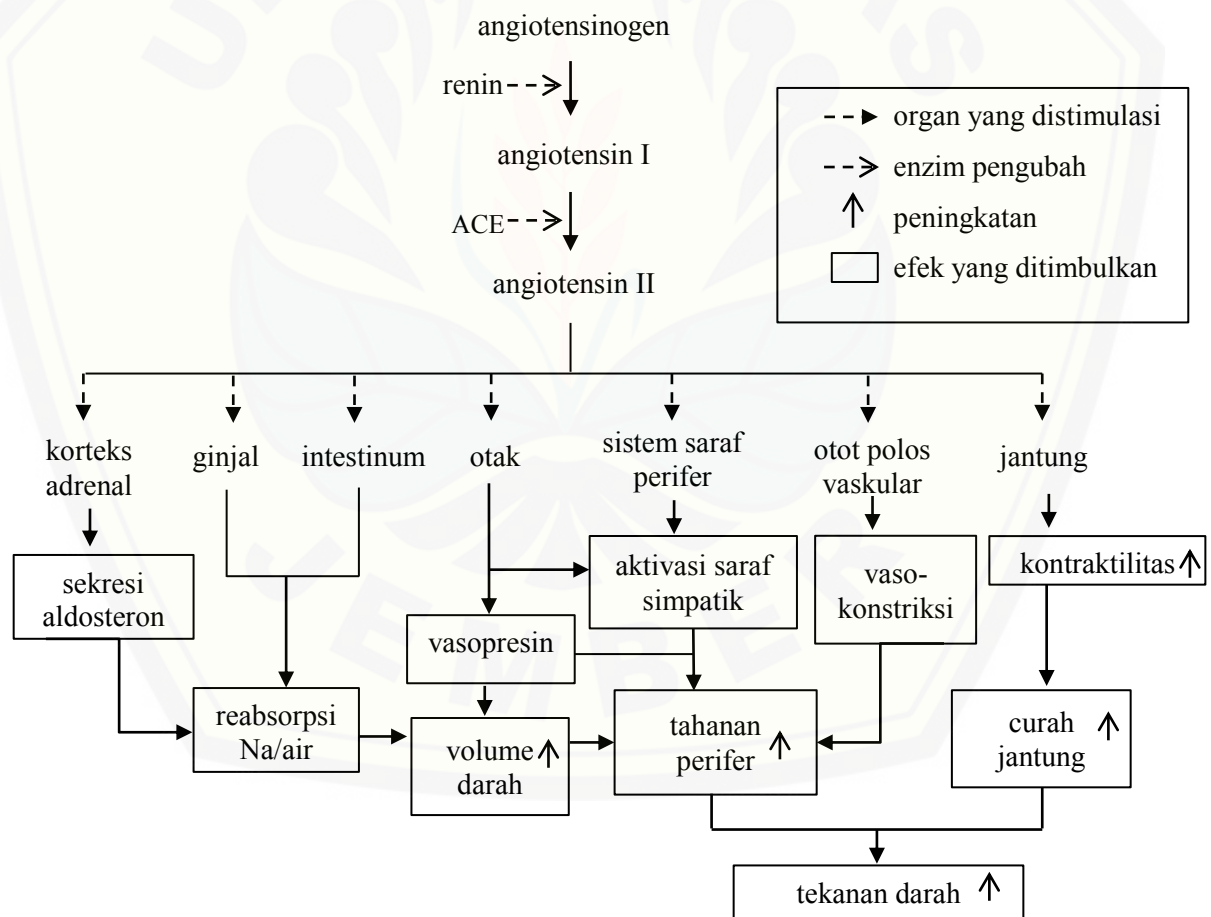
Sistem renin angiotensin mempunyai peranan yang penting dalam pengaturan tekanan darah (Dipiroet *al.*, 2007). Renin yang disekresi oleh ginjal berfungsi mengubah angiotensinogen menjadi angiotensin I. Selanjutnya oleh ACE, angiotensin I diubah menjadi angiotensin II yang dapat menyebabkan penyempitan pembuluh darah (vasokonstriksi), sehingga terjadi peningkatan tekanan darah. Angiotensin II juga merangsang pelepasan aldosteron dari zona glomerulosa kelenjar adrenal yang dapat meningkatkan tekanan darah dengan cara retensi natrium dan air. Sistem saraf simpatis dapat merangsang vasokonstriksi arteriol dan dilatasi arteriol. Oleh karena itu, sistem saraf otonom mempunyai peranan penting dalam mempertahankan tekanan darah. Terjadinya hipertensi juga merupakan hasil interaksi antara sistem saraf otonom dan sistem renin angiotensin, bersamaan dengan faktor lain termasuk asupan garam, sirkulasi darah, dan beberapa hormon tertentu (Vikrant dan Tiwari, 2001). Skema patofisiologi hipertensi ditunjukkan pada Gambar 2.1.

2.1.3 Terapi Farmakologi

Tujuan umum pengobatan hipertensi adalah penurunan mortalitas dan morbiditas yang berhubungan dengan hipertensi (Chobanian, 2003). Mortalitas dan morbiditas ini berhubungan dengan kerusakan organ target (misalnya kejadian kardiovaskular atau serebrovaskular, gagal jantung, dan penyakit ginjal). Pilihan terapi obat dipengaruhi secara bermakna oleh bukti yang menunjukkan pengurangan resiko. Target nilai tekanan darah yang direkomendasikan dalam JNC VII adalah kebanyakan pasien < 140/90 mmHg, pasien dengan diabetes < 130/80 mmHg, dan pasien dengan penyakit ginjal kronis < 130/80 mmHg (Chobanian, 2004).

Golongan obat antihipertensi yang banyak digunakan adalah diuretik tiazid (misalnya bendroflumetiazid), β -blocker (misalnya propranolol dan atenolol), ACE-inhibitor (misalnya kaptopril dan enalapril), antagonis angiotensin II (misalnya kandesartan dan losartan), calcium channel blocker (CCB) (misalnya amlodipin dan nifedipin), dan α -blocker (misalnya doksasozin). Pengobatan penyakit hipertensi menggunakan obat konvensional pada umumnya

membutuhkan jangka waktu yang panjang. Pengobatan hipertensi yang berlangsung seumur hidup dapat menimbulkan beberapa efek samping merugikan, seperti hipotensi, pusing, sakit kepala, letih, mual, diare, kram otot, nyeri perut, batuk kering, dan gangguan ginjal (Crawford, 2006). Berdasarkan penelitian Curb *et al.* (1988), penggunaan tiazid baik tunggal ataupun kombinasi selama 5 tahun dapat meningkatkan serum kolesterol. Kemudian telah dilaporkan juga, bahwa penggunaan antihipertensi golongan *ACE-inhibitor* (kaptopril) selama 3 bulan dapat menyebabkan neutropenia. Efek samping lain yang dapat ditimbulkan dari penggunaan kaptopril adalah kelelahan, nyeri dada, batuk kering, dan kerusakan pada saluran gastrointestinal. Sehingga, terapi dengan menggunakan obat tersebut perlu dihentikan (Groel *et al.*, 1983).



Gambar 2.1 Patofisiologi hipertensi (Sumber: Dipiro *et al.*, 2007)

2.2 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Tanaman melinjo tergolong ke dalam tumbuhan berbiji terbuka, tidak terbungkus daging buah tetapi terbungkus kulit luar. Distribusi melinjo ditemukan di Asia Tenggara dan Melanesia. Di Indonesia, daerah distribusi tanaman ini meliputi Sumatera dan Pulau Jawa (Manner dan Elevitch, 2006).

Melinjo mempunyai pohon yang ramping, tinggi mencapai 10-15 m, lebar daun 4-7 cm, panjang 10-20 cm. Buah melinjo berbentuk oval, pada saat masih muda kulit buah berwarna hijau dan seiring dengan pertambahan usia kulit buah melinjo berubah menjadi kuning, oranye, dan merah setelah tua. Panjang biji melinjo berkisar antara 1 – 2,5 cm tergantung dari varietas melinjo. Morfologi biji melinjo ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Morfologi biji melinjo (Sumber: worldbotanical.com)

2.2.1 Taksonomi

Klasifikasi melinjo menurut NODC Taxonomic Code (1996) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Subdivisi	: Spermatophyta
Kelas	: Gnetopsida
Ordo	: Ephedrales
Famili	: Gnetaceae
Genus	: <i>Gnetum</i> L.
Spesies	: <i>Gnetum gnemon</i> L.

2.2.2 Kandungan Gizi Melinjo

Semua bahan makanan yang berasal dari tanaman melinjo mempunyai kandungan gizi yang cukup tinggi, selain karbohidrat juga mengandung lemak, protein, mineral, dan vitamin. Komposisi bahan makanan pada melinjo dapat dilihat pada Tabel 2.2. Menurut Siswoyo dan Aldino (2007), komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari 58% pati, 16,4% lemak, 9-10% protein, dan 1% fenolik.

Tabel 2.2 Komposisi bahan makanan pada melinjo

Kandungan unsur gizi	Daun melinjo	Emping melinjo	Tangkil
Kalori (kal)	99	345	66
Protein (g)	5,0	12,0	5,0
Lemak (g)	1,3	1,5	1,7
Karbohidrat (g)	21,3	71,5	13,3
Air (g)	70,8	13,0	80,0
Vitamin A	10.000	0	1.000
Kalsium	219	100	163

Sumber: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI (1996)

Protein isolat biji melinjo mengandung asam amino bermuatan positif, negatif, hidrofilik, dan hidrofobik. Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo didominasi oleh asam aspartat (Asp) dan asam glutamat (Glu) (Siswoyo dan Sugiharto, 2012). Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Selain sebagai antioksidan (Siswoyo dan Aldino, 2007), protein biji melinjo juga memiliki aktivitas sebagai antihipertensi. Hasil penelitian Siswoyo dan Sugiharto (2012), menyebutkan bahwa protein isolat biji melinjo yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase bebas memiliki aktivitas sebagai ACE-*inhibitor*. Hal tersebut menjadi dasar dari penelitian Puspitaningrum *et al.* (2013) yang menguji aktivitas antihipertensi secara *in vivo*. Hasilnya, protein hidrolisat biji melinjo mampu menurunkan tekanan darah tikus Wistar yang dibuat hipertensi.

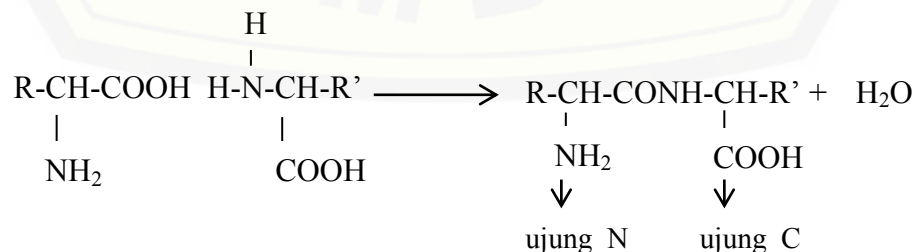
Tabel 2.3 Komposisi asam amino dari protein isolat biji melinjo

Asam amino	Protein isolat (%)
Asam aspartat (Asp)	12,830
Treonin (Thr)	7,141
Serin (Ser)	7,825
Asam glutamat (Glu)	12,813
Prolin (Pro)	2,398
Glisin (Gly)	8,909
Alanin (Ala)	6,542
Sistein (Cys)	0,147
Valin (Val)	8,449
Metionin (Met)	0,516
Isoleusin (Ile)	4,799
Leusin (Leu)	8,512
Tirosin (Tyr)	5,716
Fenilalanin (Phe)	1,863
Histidin (His)	0,516
Lisin (Lys)	6,392
Arginin (Arg)	2,854

Sumber: Siswoyo dan Sugiharto (2012)

2.3 Protein

Protein merupakan polipeptida berbobot molekul tinggi, tersusun atas beberapa asam amino yang bergabung membentuk ikatan peptida (-CONH-). Asam amino adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus karboksil (-COOH) dan satu atau lebih gugus amino (-NH₂) yang salah satunya terletak pada atom C tepat disebelah gugus karboksil (atom C alfa). Asam-asam amino bergabung melalui ikatan peptida, yaitu ikatan antara gugus karboksil dari asam amino dengan gugus amino dari asam amino yang di sampingnya (Sudarmadji, 1989). Pembentukan ikatan peptida ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Pembentukan ikatan peptida di antara dua asam amino (Sumber: Jain, 2005)

2.3.1 Isolasi Protein

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

a. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah awal untuk mendapatkan sampel protein kasar dengan cara memisahkan protein dari berbagai substansi dalam sampel secara selektif (Berkelman dan Stenstedt, 1998). Ekstraksi protein dipengaruhi oleh sifat fisika, kimia, dan struktural seperti kelarutan, hidrofobisitas, berat molekul, titik isoelektrik, dan lain-lain (Maqueda *et al.*, 2013). Berdasarkan kelarutannya, metode ekstraksi protein dibagi menjadi empat fraksi, yaitu protein larut air (albumin), larut garam (globulin), larut asam (glutein), dan larut alkohol (prolamin) (Ju *et al.*, 2001).

b. Presipitasi

Presipitasi bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi protein yang didapatkan (Maqueda *et al.*, 2013). Protein dapat dipresipitasi dengan menggunakan ammonium sulfat, pelarut organik, dan pengaturan pH.

1) Ammonium sulfat

Ammonium sulfat merupakan presipitan garam yang sering digunakan untuk mempresipitasi protein dengan cara *salting out* (Englard dan Seifter, 1990).

2) Pelarut organik

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

3) Pengaturan pH

Daya larut protein tergantung pH dan mencapai minimum pada titik isoelektriknya (Bintang, 2010). Pada pH basa (8-9), kelarutan protein

meningkat karena interaksi elektrostatisnya menurun sehingga kondisi ini sangat baik untuk mengestrak protein. Pada pH asam (4-6) protein mengalami presipitasi, karena interaksi elektrostatis antar protein meningkat sehingga menurunkan interaksi dengan air (Salcedo-Chavez *et al.*, 2002).

2.3.2 Hidrolisis Protein

Hidrolisis protein merupakan protein yang mengalami degradasi hidrolitik dengan asam, basa, atau enzim proteolitik yang menghasilkan produk berupa asam amino dan peptida (Haslaniza, 2010). Penggunaan enzim dalam menghidrolisis protein dianggap paling aman dan menguntungkan. 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).

Ada tiga cara yang dapat digunakan untuk menghidrolisis protein, yaitu hidrolisis menggunakan asam, basa, dan enzim.

a. Hidrolisis asam

Hidrolisis dengan menggunakan beberapa asam kuat organik seperti HCl atau H_2SO_4 pekat. Pemanasan pada suhu serta tekanan tertentu selama waktu tertentu. Hidrolisis asam dapat merusak beberapa asam amino (triptofan, serin, dan treonin), menyebabkan deaminasi menjadi asam aspartat dan asam glutamat (asparagin dan glutamin), serta membuat asam aminomengalami dehidrasi intermolekuler (Sumardjo, 2009).

b. Hidrolisis basa

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

c. Hidrolisis enzimatik

Hidrolisis enzimatik dilakukan dengan menggunakan enzim. Dapat digunakan satu jenis enzim saja, atau beberapa jenis enzim yang berbeda. Pada penambahan enzim perlu dilakukan pengaturan kondisi pH dan suhu optimal. Dibandingkan dengan hidrolisis kimia (menggunakan asam dan basa), hidrolisis enzimatik lebih menguntungkan karena tidak mengakibatkan kerusakan asam amino dan asam-asam amino bebas. Peptida dengan rantai pendek yang dihasilkan lebih bervariasi, reaksi dapat dipercepat kira-kira 10^{12} sampai 10^{20} , tingkat kehilangan asam amino esensial lebih rendah, biaya produksi relatif lebih murah dan menghasilkan komposisi asam amino tertentu terutama peptida rantai pendek (dipeptida dan tripeptida) yang mudah diabsorpsi oleh tubuh.

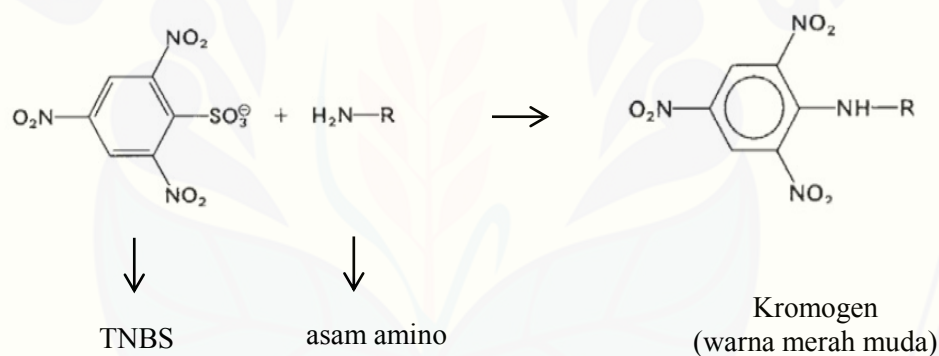
Protein dengan berat molekul yang rendah dapat diperoleh dengan menghidrolisis protein secara enzimatik (Zhidong *et al.*, 2013). Selain itu, juga memiliki struktur sekunder yang lebih sedikit daripada sebelum dihidrolisis, sehingga dapat memperbaiki fungsinya seperti meningkatkan kelarutan mendekati titik isoelektrik (Kong *et al.*, 2007) dan meningkatkan ketahanan terhadap panas (Ortiz dan Wagner, 2002). Hidrolisis protein dapat menggunakan enzim proteolitik seperti alkalase, *flavorzyme*, *protamex*, dan *neutralse* yang memiliki perbedaan karakteristik pada produk hasil hidrolisisnya (You *et al.*, 2009; Muhamyankaka *et al.*, 2013).

Alkalase merupakan enzim alkali yang dihasilkan dari *Bacillus licheniformis*. Menurut Hoo dan Babji (2011), protein yang dihidrolisis menggunakan enzim alkalase memiliki perolehan protein yang paling tinggi dibandingkan dengan enzim papain dan *neutralse*. Enzim alkalase sangat efektif digunakan dalam teknik modifikasi protein. Enzim ini mampu meningkatkan aktivitas *ACE-inhibitor* sampai 10-15 kali (Siswoyo dan Sugiharto, 2012). Kemampuan dalam menghidrolisis, dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan derajat hidrolisis (DH), yang merupakan parameter untuk mengetahui berapa persen ikatan peptida yang dipotong,

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

h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein. h_{tot} tergantung pada komposisi asam amino sebelum dihidrolisis (Nielsen *et al.*, 2010).

Metode yang dapat digunakan untuk memonitoring DH dalam hidrolisis protein antara lain pH-stat, *osmometry*, *soluble nitrogen content*, dan asam trinitro benzen sulfonat (TNBS) (Nielsen, 2010). Metode yang sering digunakan adalah metode TNBS. Metode TNBS didasarkan pada reaksi primer antara asam amino dengan reagen TNBS yang akan membentuk kromofor, dan kemudian dilihat absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Adler-Nissen, 1979). Reaksi asam amino dengan reagen TNBS ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi reagen TNBS dengan asam amino (Sumber: Adler-Nissen, 1979)

2.3.3 Analisis Kuantitatif Protein

Metode yang sering digunakan untuk menentukan kadar protein yang didapat yaitu uji Bradford karena paling reproduibel, cepat, dan cukup akurat dibandingkan metode lainnya (Bradford, 1976). Metode ini dapat mendeteksi sampel yang mengandung protein kurang dari 0,01 mg/mL. Metode Bradford merupakan suatu metode dalam penentuan kadar protein suatu bahan yang prinsip kerjanya didasarkan pada pengikatan secara langsung zat warna *coomasie brilliant blue G250* (CBBG) oleh protein yang mengandung residu asam amino dengan rantai samping aromatik (tirosin, triptofan, dan fenilalanin) atau bersifat basa

(arginin, histidin, dan leusin). Reagen CBBG bebas berwarna merah kecoklatan (λ_{\max} 465 nm), sedangkan dalam suasana basa, reagen CBBG akan berbentuk anion yang akan mengikat protein membentuk warna biru (λ_{\max} 595 nm). Jumlah CBBG yang terikat pada protein proporsional dengan muatan positif yang ditemukan pada protein (Stoscheck, 1990).

2.3.4 Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Pemisahan protein menggunakan elektroforesis didasarkan pada muatan molekul yang akan bermigrasi melewati matriks ketika diberikan muatan listrik (elektroda) (Hames, 1998). Metode *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein berdasarkan berat molekulnya (Berkelman dan Stenstedt, 1998).

SDS adalah deterjen anionik yang memiliki muatan negatif dalam range pH yang luas. Suatu rantai polipeptida dapat berikatan dengan SDS sesuai dengan ukuran molekul (*molecular mass*). Muatan asli protein akan digantikan oleh muatan negatif dari anion yang terikat kompleks protein-SDS memiliki rasio muatan per berat molekul yang konstan (Hames, 1998). Muatan negatif SDS akan menghancurkan sebagian besar struktur kompleks protein dan akan tertarik ke arah anoda (*positively charged electrode*) bila ditempatkan dalam suatu medan elektrik.

Untuk melihat pita komponen yang terbentuk, gel perlu diwarnai dengan pewarna khusus, seperti *commasie brilliant blue* dan *silver salt staining*. Berat molekul protein dapat diketahui dengan membandingkan Rf protein dengan standar yang berat molekulnya telah diketahui (Wilson dan Walker, 2000). Molekul pada SDS berpindah berdasarkan massa molekulnya. Molekul yang bermassa kecil akan lebih cepat berpindah di dalam gel dan akan membentuk pita tunggal, yang merupakan kriteria pemurnian dengan berat molekul tertentu (Deutscher, 1990).

2.4 Imobilisasi Enzim

Imobilisasi enzim didefinisikan sebagai enzim yang secara fisik ditempatkan dalam suatu matriks padat (*support*) dengan tetap memiliki aktivitas katalitiknya (Katchalski-Katzir, 1993). Keuntungan dari proses imobilisasi enzim antara lain, enzim dapat digunakan secara berulang-ulang, produk hasil reaksi dapat dengan mudah dipisahkan dan dalam beberapa kasus sifat enzim (aktivitas dan stabilitas) dapat berubah menjadi lebih baik (Pereira, 2003). Keuntungan lainnya adalah proses reaksi enzimatik dapat dijalankan secara kontinyu dan dapat dikontrol secara langsung, serta dapat mencegah enzim mengalami autolisis (Tardioli *et al.*, 2003).

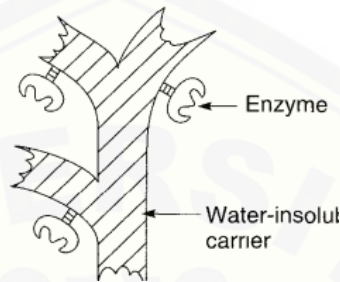
Menurut Corici *et al.* (2011), alkalase terimobilisasi merupakan katalis yang paling baik dalam mensintesis peptida menjadi amida yang stabil. Banyak metode yang telah diteliti terkait teknik imobilisasi enzim, yaitu pengikatan kovalen, pengikatan ionik, adsorpsi hidrofobik, dan penjerapan (enkapsulasi) dalam polimer atau matriks anorganik. Tujuannya adalah untuk mengetahui metode yang memberikan hasil paling tinggi dan teknik imobilisasi yang reproduksibel. Penjerapan enzim dalam matriks silika telah terbukti dapat memperbaiki efisiensi katalisis dari berbagai enzim. Metode penjerapan dalam matriks sol-gel dapat memperbaiki ketahanan terhadap denaturasi kimia dan suhu serta meningkatkan stabilitas selama penyimpanan dan penggunaan (Zarcula *et al.*, 2010).

2.4.1 Metode Imobilisasi Enzim

a. Metode pengikatan enzim pada padatan pendukung (*carrier-binding*)

Metode pengikatan enzim pada padatan pendukung merupakan metode tertua dalam imobilisasi enzim. Pada metode ini, jumlah enzim yang terikat pada pembawa dan aktivitas enzim setelah diimobilisasi bergantung pada sifat pembawanya. Pemilihan jenis pembawa akan bergantung pada karakteristik enzim seperti ukuran partikel, luas permukaan, perbandingan gugus hidrofob dengan hidrofил, dan komposisi kimia enzim (Arica *et al.*, 2001). Beberapa jenis pembawa yang digunakan adalah turunan polisakarida seperti selulosa, dekstran, agarosa,

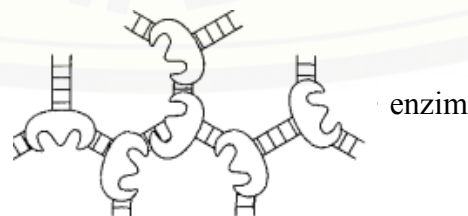
dan gel poliakrilamid. Pada metode ini, enzim dan pembawa memiliki ikatan yang lemah. Sehingga, enzim akan mudah terlepas dari pembawa selama pemakaian (Homaei *et al.*, 2013). Metode pengikatan enzim pada padatan pendukung ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Metode pengikatan enzim pada padatan pendukung (Sumber: Katchalski-Katzir, 1993)

b. Metode pengikatan silang (*cross linking*)

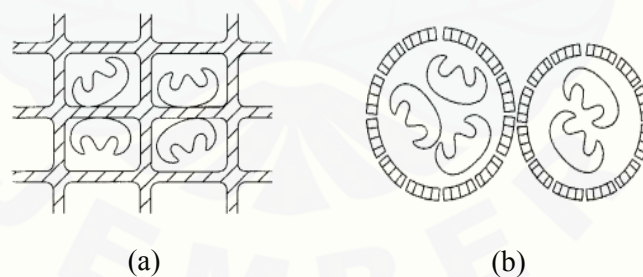
Metode ini didasarkan pada pembentukan ikatan kimia seperti metode pengikatan kovalen, namun pembawa yang tidak larut dalam air tidak digunakan dalam metode ini. Imobilisasi enzim dilakukan dengan pembentukan ikatan silang intermolekuler diantara molekul enzim dengan penambahan reagen bifungsi atau multifungsi (Betancor *et al.*, 2006). Metode pengikatan silang merupakan metode yang efektif dan dapat bertahan lama dalam penggunaannya. Namun, metode tersebut tidak ekonomis dan dapat memperburuk cara kerja enzim (Homaei *et al.*, 2013). Metode pengikatan silang ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Metode pengikatan silang (Sumber: Katchalski-Katzir, 1993)

c. Metode penjerapan (*entrapment*)

Imobilisasi enzim dengan teknik penjerapan didasarkan pada penempatan enzim di dalam kisi-kisi matriks polimer atau membran. Teknik ini berbeda dengan teknik imobilisasi pengikatan secara kovalen maupun secara pengikatan silang, karena enzim tidak terikat pada kisi-kisi membran atau polimer. Terdapat dua jenis penjerapan enzim, yaitu penjerapan ke dalam matriks dan ke dalam mikrokapsul. Tipe kisi berupa penjerapan enzim di dalam ruang interstisial dari pengikatan silang polimer tidak larut air. Sedangkan tipe mikrokapsul berupa enzim yang dimasukkan ke dalam membran polimer semipermeabel. Metode penjerapan merupakan metode yang paling mudah dan efektif untuk teknik imobilisasi enzim (Reetz *et al.*, 2003). Metode ini dapat menjaga struktur enzim. Protein atau enzim dapat dengan mudah pecah (membentuk mikromolekul) dan membentuk agregat akibat penambahan agen eksternal seperti protease. Dengan menggunakan metode ini, maka akan terjadi penjerapan pecahan makromolekul tersebut. Hal tersebut dapat mencegah terjadinya agregasi dan denaturasi dari protein atau enzim (Homaei *et al.*, 2013). Metode penjerapan ditunjukkan pada Gambar 2.7 (a) dan (b).



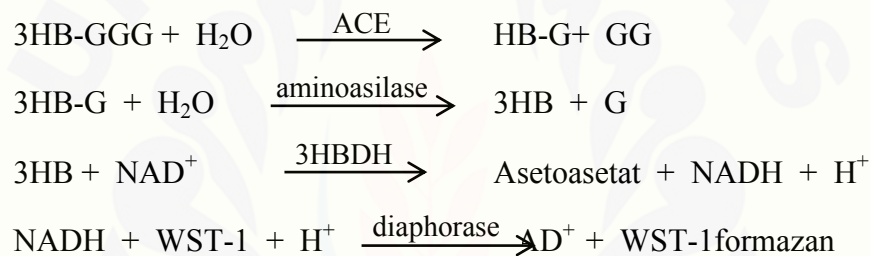
(a) Tipe kisi; (b) Tipe mikrokapsul

Gambar 2.7 Metode penjerapan (Sumber: Katchalski-Katzir, 1993)

2.5 Penentuan Aktivitas Antihipertensi

Aktivitas antihipertensi dapat ditentukan secara *in vitro* dengan menggunakan kit. Metode ini menggunakan prinsip inhibisi, yaitu sampel ditambahkan pada campuran yang mengandung ACE, enzim aminoasilase, dan

substrat 3HB-GGG. Substrat 3HB-GGG selama inkubasi akan dipecah menjadi 3HB-G dan G-G kemudian 3HB dan G. Pengaruh inhibisi dilihat dari kemampuan sampel dalam menghambat 3HB yang terbentuk. Reaksi yang terjadi merupakan reaksi secara tidak langsung. 3HB yang terbentuk akan dioksidasi hingga menghasilkan larutan berwarna kuning (formazan) pada akhir reaksi. Metode ini lebih sensitif, cepat, dan akurat. Nilai absorbansi larutan blanko dan sampel diukur pada panjang gelombang λ 450 nm. Metode ini dikembangkan dengan menggunakan *water soluble tetrazolium salt* (WST-1). WST-1 dapat dengan mudah direduksi oleh NADH atau agen pereduksi lain (Lam *et al.*, 2008). Prinsip kerja ACE-*inhibitor* dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Prinsip kerja ACE-*inhibitor* (Sumber: Lam *et al.*, 2008)

Keterangan:

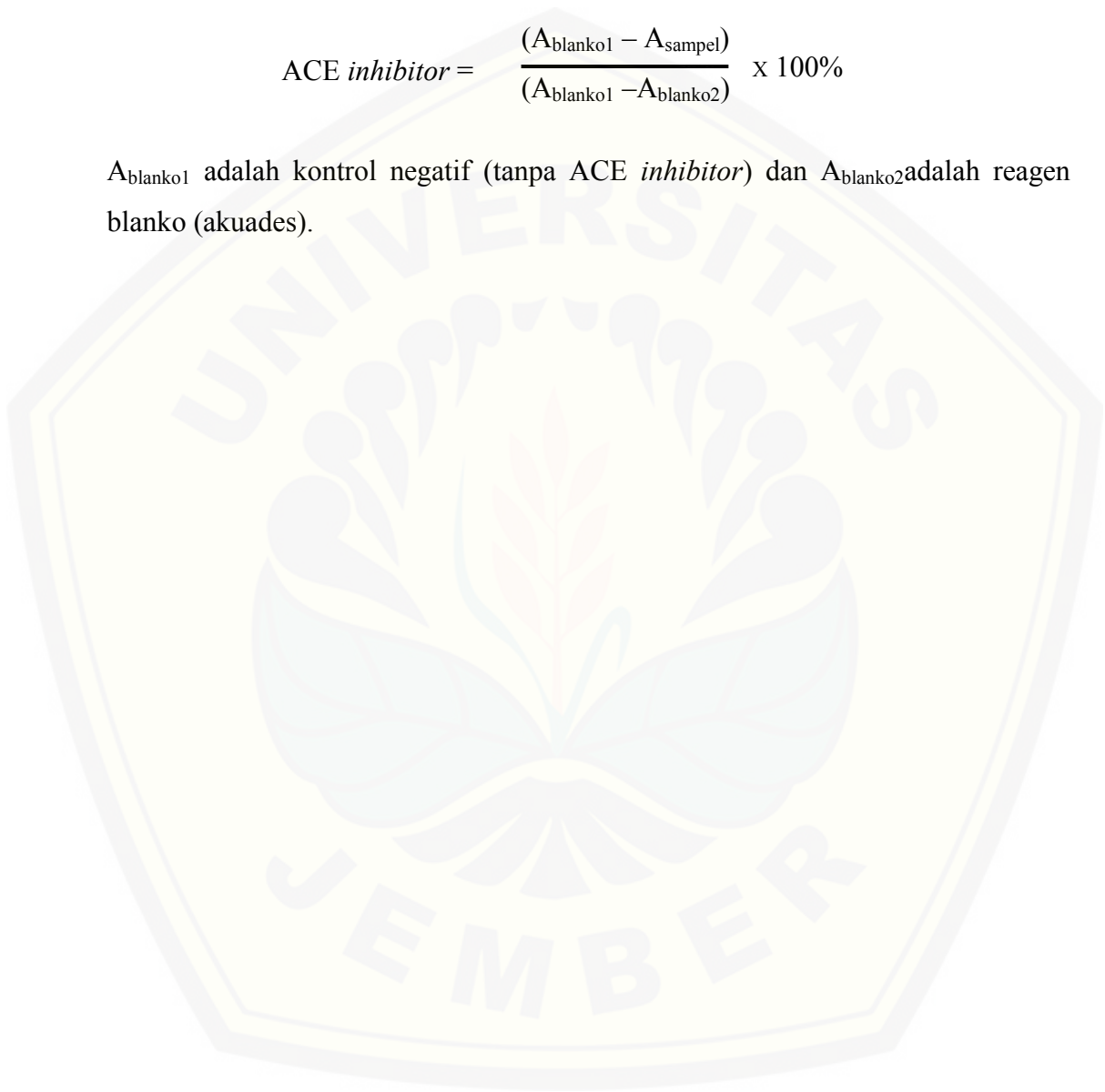
3HB-GGG	: 3-hidroksi butirat glisil-glisil-glisin
3HB	: 3-hidroksibutirat
3HBDH	: 3-hidroksibutirat dehidrogenase
GG	: glisil-glisin
G	: glisil

Besarnya kemampuan penghambatan ACE dinyatakan sebagai persen ACE *inhibitor*. Semakin besar nilai persen ACE *inhibitor*, maka semakin kuat senyawa tersebut dalam menghambat ACE. Pengukuran IC_{50} dilakukan dengan algoritma regresi nonlinier dari besar persen ACE *inhibitor*. Nilai IC_{50}

menunjukkan besar konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat ACE sebanyak 50%. Besarnya nilai ACE *inhibitor* dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$ACE\ inhibitor = \frac{(A_{\text{blanko1}} - A_{\text{sampel}})}{(A_{\text{blanko1}} - A_{\text{blanko2}})} \times 100\%$$

A_{blanko1} adalah kontrol negatif (tanpa ACE *inhibitor*) dan A_{blanko2} adalah reagen blanko (akuades).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

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

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *center for development of advance science and technology* (CDAST) Universitas Jember. Waktu penelitian pada bulan September 2015 sampai selesai.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah biji melinjo yang sudah masak secara fisiologis, ditandai dengan kulit luar berwarna merah tua. Biji melinjo tersebut diperoleh dari petani di daerah Kalibaru, Kabupaten Banyuwangi, yang dipanen pada bulan Juli 2015 pada pagi hari.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

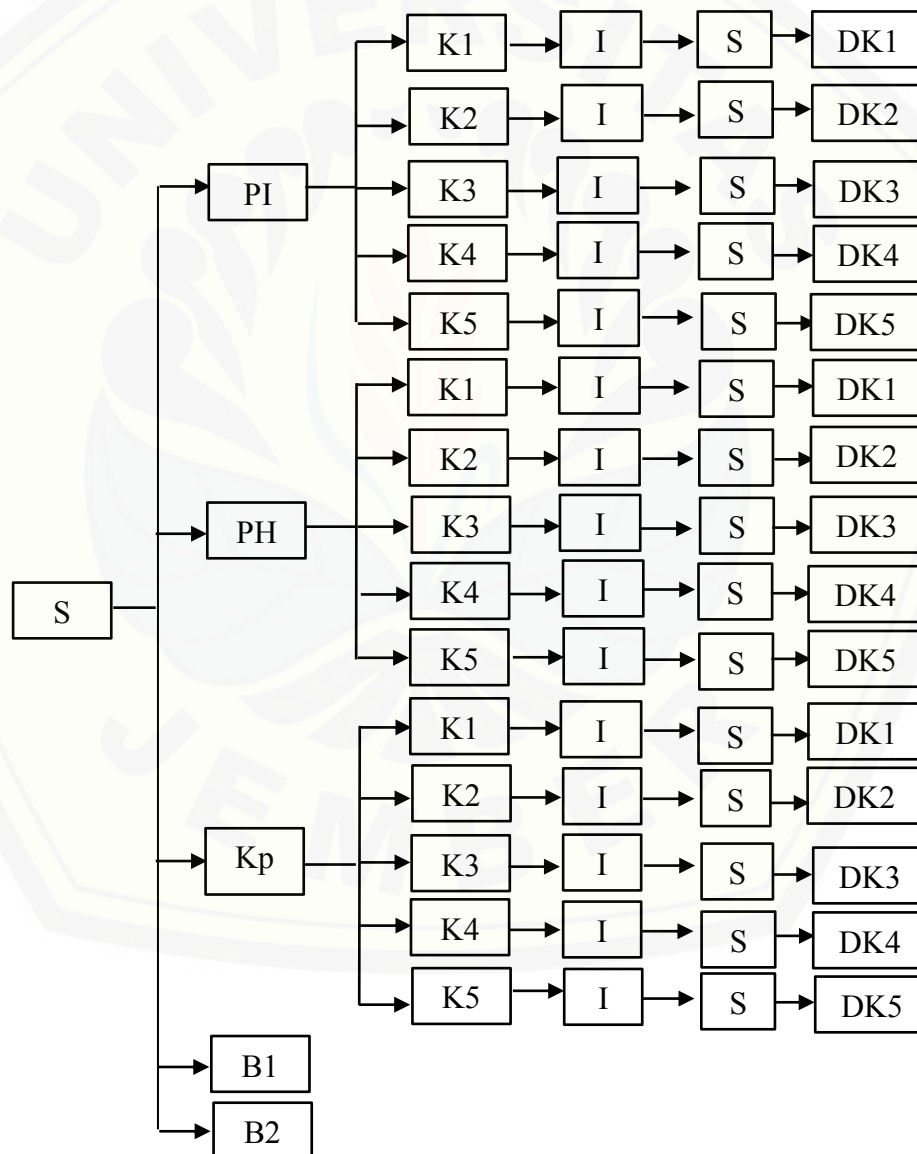
Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *shaker incubator* (Stuart S1600), oven (Carbolite), sentrifuse (Tomy MRX-150 dan Hitachi CR21GIII), spektrofotometer (Hitachi tipe U-2900 UV-Vis), elektroforesis SDS-PAGE (Bio-Rad), *dry block heater* (Techne), FTIR (Bruker Alfa), stirer, vortex, timbangan analitik, blender, mikropipet, dan *syringe* Hamilton.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji melinjo; akuades; 0,2 M buffer fosfat pH 8; 1M HCl; 1 M NaOH; 0,1 M Na₂SO₃; enzimalkalase 24L FG (2,4 AU/g dan densitasnya 1,18 g/mL); *separating gel* 17%; *stacking gel*; larutan pewarna (*staining* dan *destaining*); *running buffer*; 0,1% reagen asam trinitro

benzen sulfonat(TNBS); reagen Bradford; PEG 20000; 1 M NaF (Wako); isopropil alkohol; *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma); dimetil dimetoksi silan(DMDMOS) (Ald rich); tetrametil ortosilikat (TMOS) (Shin etsu); standar L-leusin (Wako), dan marka protein (NEB #7706).

3.5 Rancangan Penelitian

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



- PI : Protein isolat biji melinjo
PH : Protein hidrolisat biji melinjo
Kp : Kontrol positif (kaptopril)
B1 : Blanko 1
B2 : Blanko 2
K1 : Perlakuan dengan konsentrasi sampel 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
K2 : Perlakuan dengan konsentrasi sampel 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
K3 : Perlakuan dengan konsentrasi sampel 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
K4 : Perlakuan dengan konsentrasi sampel 0,002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
K5 : Perlakuan dengan konsentrasi sampel 0,0002 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
I : Inkubasi
S : Pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 450 nm
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

- a. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi sampel uji protein kasar (Gg-PK), protein isolat (Gg-PI), dan protein hidrolisat (Gg-PH) biji melinjo.
- b. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah derajat hidrolisis (%), aktivitas *ACE inhibitor* (%), dan nilai IC_{50} .
- c. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah waktu dan suhu inkubasi, jumlah enzim, konsentrasi substrat, dan cara ekstraksi sampel.

3.7 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini yaitu

- a. Pengujian *ACE inhibitor* adalah pengujian untuk mengetahui aktivitas penghambatan pada ACE yang berperan dalam peningkatan tekanan darah.

- b. IC_{50} adalah besarnya konsentrasi sampel yang mampu memberikan penghambatan sebesar 50%.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Preparasi Imobilisasi Enzim Alkalase

Metode imobilisasi menggunakan prosedur Reetz (2003) pada penyerapan lipase. Dalam gelas vial 10 mL, larutan alkalase 3,12 mL, PEG 2000 0,8 mL, NaF 0,4 mL, dan isopropil alkohol 0,8 mL dicampur dan dihomogenkan menggunakan stirer magnetik pada kecepatan 600 rpm. Kemudian ditambahkan 24 mmol DDMOS/TMOS (1:1). Larutan diaduk pada suhu ruang hingga terbentuk gel. Gel yang diperoleh dikeringkan dalam ruang dingin (4°C). Enzim yang telah terimobilisasi kemudian diamati menggunakan SEM dan FTIR.

3.8.2 Ekstraksi Biji Melinjo

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode standart ekstraksi. Bahan baku yang digunakan adalah 25 gram biji melinjo yang telah masak secara fisiologis. Kulit biji melinjo dibuang dan dihilangkan lapisan kedua pada biji. Biji lapisan ketiga dihaluskan dengan menambahkan akuades sebanyak 75 mL (perbandingan 1:3). Kemudian disaring dan larutan yang diperoleh dimasukkan ke dalam *tube* dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 15°C. supernatan yang dihasilkan dari proses ini disebut sebagai protein kasar biji melinjo (Gg-PK).

3.8.3 Isolasi Protein Biji Melinjo

Isolasi protein dilakukan dengan menggunakan metode presipitasi isoelektrik (Salcedo-Chavez *et al.*, 2002). Supernatan hasil sentrifugasi dari proses ekstraksi biji melinjo diatur pHnya menjadi 4 dengan menambahkan 1 M HCl. 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 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. Endapan protein dilarutkan dengan air destilat dan diatur pHnya sampai 8 dengan menggunakan NaOH 1 N. Hasil dari isolasi protein ini disebut sebagai protein isolat biji melinjo (Gg-PI).

3.8.4 Hidrolisis Protein Isolat Biji Melinjo

Optimasi kondisi dilakukan terlebih dahulu sebelum melaksanakan hidrolisis protein isolat biji melinjo. Optimasi yang dilakukan adalah optimasi suhu inkubasi (30, 40, 50, dan 60°C), waktu inkubasi (0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 18, dan 24 jam), jumlah enzim (1, 5, 10, dan 20 mg), dan konsentrasi substrat (2; 4; 5; 6; dan 8 mg/mL). Proses hidrolisis didasarkan pada metode yang telah dilakukan oleh Siswoyo dan Sugiharto (2012). Protein isolat 200 µl ditambahkan dengan enzim terimobilisasi dan buffer fosfat (pH 8) 300 µl. Campuran kemudian diinkubasi dan hasilnya disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 25°C. Bagian supernatan diambil sebagai protein hidrolisat bijimelinjo (Gg-PH) yang selanjutnya ditentukan derajat hidrolisisnya. Semua pengujian dilakukan tiga kali replikasi.

3.8.5 Penentuan Total Protein Terlarut

Kandungan protein diukur dengan metode Bradford (1970). Sampel sebanyak 5 µl ditambahkan dengan 45 µl akuades dan ditambah dengan 950 µl larutan Bradford, kemudian absorban diukur pada panjang gelombang λ 595 nm. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan standar BSA (konsentrasi 1; 5; 10; 15; dan 20 µg/µl) untuk mengetahui kandungan protein terlarut.

3.8.6 Pengukuran Derajat Hidrolisis

Derajat hidrolisis ditentukan menggunakan metode TNBS (Adler-Nissen, 1979). Sampel 5µl dicampur dengan 400µl 0,2 M buffer fosfat (pH 8) dan 200µl 0,1% TNBS, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 400µl 0,1 N Na₂SO₃ lalu didinginkan pada suhu ruang, kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm. Kurva

standart *L-leucine* digunakan untuk mengetahui konsentrasi asam amino. Persentasi derajat hidrolisis (DH) ditentukan dengan persamaan sebagai berikut:

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

h adalah jumlah ikatan peptida yang dihidrolisis dan h_{tot} adalah jumlah total ikatan peptida per ekuivalen protein.

3.8.7 Elektroforesis SDS-PAGE

Analisis pola pita protein menggunakan 17% SDS-PAGE sesuai dengan metode Laemmli (1970). *Separating gel* 17% dituang kedalam *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* (sisir) dimasukkan untuk membuat sumuran sampel. *Plate* yang sudah berisi gel kemudian dimasukkan ke dalam *chamber*. *Running buffer* dituang sampai bagian atas dan bawah gel terendam. Selanjutnya, sampel buffer ditambahkan ke dalam sampel protein (perbandingan 1:1) dalam tabung *microtube* kemudian dipanaskan pada suhu 95°C selama 4 menit. Sampel sebanyak 25 µl dan marker protein dimasukan ke dalam sumur gel menggunakan *syringe* Hamilton, kemudian *running* pada arus 50-80 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 pewarna (*staining*) sambil digoyang pada kecepatan 36 rpm selama 30 menit untuk mewarnai pita protein. Setelah itu, larutan pewarna dituang kembali pada wadahnya kemudian gel dibilas dengan akuades. Pencucian gel dilakukan dengan merendam gel di dalam larutan pewarna (*destaining*), 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 diketahui dengan membandingkan antara pola protein sampel dengan marka protein yang telah diketahui berat molekulnya.

3.8.8 Uji Aktivitas Antihipertensi Protein Biji Melinjo

Aktivitas antihipertensi ditentukan dengan menggunakan seperangkat ACE kit-WST-1 (Lamet *al.*, 2008). Larutan sampel dipreparasi dengan proses pengenceran (konsentrasi sampel 2 µg/µl). Pengujian dilakukan dengan menambahkan 20 µl larutan sampel, 20 µl buffer substrat, dan 20 µl larutan kerja enzim ke dalam *microplate*. Blanko 1 dibuat dengan menambahkan 20 µl akuades, 20 µl buffer substrat, dan 20 µl larutan kerja enzim ke dalam *microplate*. Sedangkan, blanko 2 dibuat dengan menambahkan 40 µl akuades dan 20 µl buffer substrat ke dalam *microplate*. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya, dimasukkan 200 µl larutan indikator dan diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu ruang. Ukur absorbansi pada panjang gelombang 450 nm. Kemudian ditentukan aktivitas ACE inhibitor dan analisis IC₅₀. Nilai IC₅₀ ditentukan dengan menggunakan kurva inhibisi dari aktivitas ACE inhibitor. Sedangkan aktivitas ACE inhibitor dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$ACE\ inhibitor(\%) = \frac{(A_{blanko1} - A_{sampel})}{(A_{blanko1} - A_{blanko2})} \times 100\%$$

Keterangan:

A : Absorbansi

A_{blanko1} : Kontrol negatif (tanpa ACE inhibitor)

A_{blanko2} : Blanko

3.9 Analisis Data

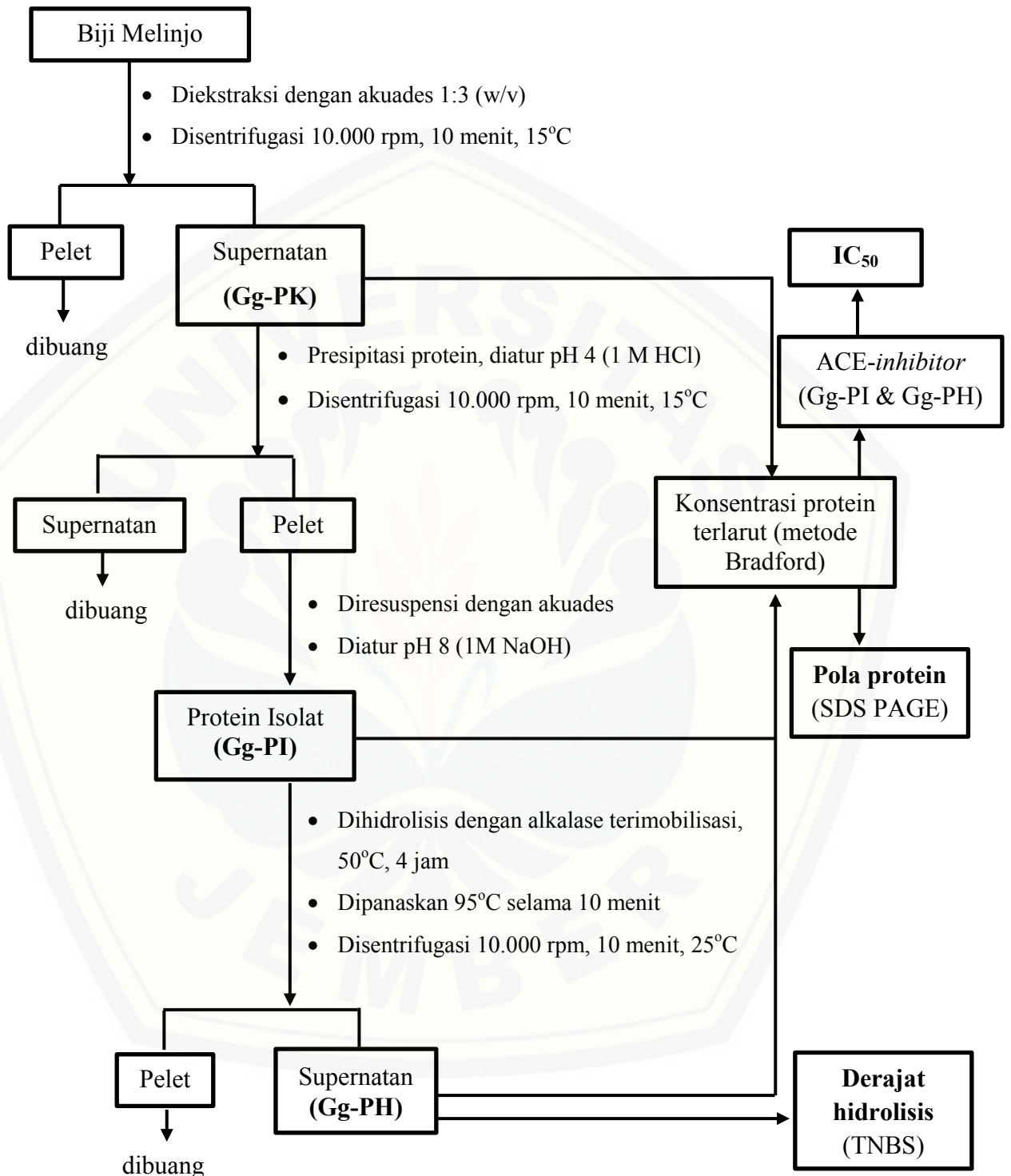
Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah derajat hidrolisis (%), profil pita protein, dan IC₅₀. Derajat hidrolisis (%) protein hidrolisat ditentukan untuk mengetahui berapa persen ikatan peptida yang dipotong. Hidrolisis dikatakan baik jika nilai derajat hidrolisis (%) ≥ 30% (Himonides *et al.*, 2011).

Profil pita protein yang diperoleh dari elektroforesis SDS-PAGE digunakan untuk mengetahui keberhasilan hidrolisis protein. Protein dikatakan telah berhasil terhidrolisis apabila profil pita dari protein hidrolisat (Gg-PH) pada

berat molekul tertentu tidak terlihat jelas (memiliki berat molekul yang lebih rendah).

Nilai IC_{50} ditentukan dengan menggunakan analisis probit. Data yang diperoleh kemudian diuji normalitas dan homogenitasnya. Apabila data terdistribusi normal, maka dianalisis menggunakan *one way* ANOVA untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan pada masing-masing perlakuan (nilai $p < 0,05$ menunjukkan hasil yang diperoleh tidak berbeda secara signifikan). Kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* tipe LSD untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan secara signifikan. Apabila data tidak terdistribusi normal, maka dilakukan transformasi data dan jika variabel hasil transformasi tidak normal, maka dilakukan uji non parametrik.

3.10 Skema Kerja Penelitian



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut:

- a) Enzim alkalase terimobilisasi efektif dalam menghidrolisis protein biji melinjo, ditandai dengan DH lebih dari 30% pada dua kali penggunaan.
- b) Protein hidrolisat biji melinjo (Gg-PH) memiliki aktivitas sebagai antihipertensi yang lebih tinggi dibandingkan protein isolat biji melinjo (Gg-PI), dengan nilai $IC_{50} 2,457 \pm 0,213 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

5.2 Saran

Untuk pemanfaatan protein biji melinjo sebagai antihipertensi secara maksimal perlu dilakukan uji lanjutan seperti uji *in vivo*, uji toksisitas, dan uji klinis.

DAFTAR PUSTAKA

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Titrobenzenesulfonic Acid. *Agric. Food Chem*, 27 (6): 1256-1262.
- Arnao, M.B. 2000. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity using Chromogen Radical: a Practical Case. *Trends Food Sci. Technol.* 11:419-421.
- Azhar, K.T., Siwoyo, T.A., dan Santosa, A. 2014. Uji Aktivitas Protein Isolat Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) sebagai Antihipertensi secara In Vivo. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 2 (3): 382-386.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Berkelman, T., dan Stenstedt, T. 1998. *2-DElectrophoresis Using Immobilized pH Gradient, Principles and Methods*. USA: Amersham Bioscience
- Betancor, L., Lopez, F., Hidalgo, A., Alonso, N., Ortiz, G.D., Lafuenta, R.F., dan Guisan, J.M. 2006. Different Mechanisms of Protein Immobilization on Glutaraldehyde Activated Supports: Effect of Support Activation and Immobilization Condition. *Elsevier*, 39: 877-882.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Corici, L.N., Frissen, A.E., Zoelen, D.J., Eggen, I.F., Peter, F., Davidescu, C.M., dan Boeriu, C.G. 2011. Sol-gel Immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for Application in the Synthesis of C-terminal Peptide Amides. *Mol. Catal. B: Enzymatic*, 73: 90-97.
- Chobanian, A.V. 2004. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. US: Department of Health and Human Services.
- Deutscher, M.P. 1990. *Methods in Enzymology Vol. 182 (Guide to Protein Purification)*. New York: Academic Press.

- Crawford, M.H. 2006. *Current Diagnosis and Treatment in Cardiology*. Lange Medical Book.
- Curb, J.D., Schneider, K., Taylor, J.O., Maxwell, M., dan Shulman, N. 1988. Antihypertensive Drug Side Effects in the Hypertension Detection and Follow-up Program. *Suppl. II Hypertension*, 11 (3): 51-55.
- Depkes RI. 2014. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Depkes RI.
- Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.C., Wells, B.G., dan Posey, L.M. 2007. *Pharmacotherapy Seventh Edition*. New York: McGraw Hill.
- Direktorat Gizi Depkes RI. 1996. *Kandungan Gizi Melinjo*. Jakarta: Direktorat Gizi Departemen Kesehatan RI.
- Direktorat Gizi Depkes RI. 1979. *Daftar Komposisi Bahan Makanan*. Jakarta: Bhatara Karya Aksara.
- Elias, R., Kellerby, S., dan Decker, E., 2008. Antioxidant Activity of Protein Peptides. *Critical Review in Food Sci.Nutrition*, 48: 430-441.
- Englard, S. dan Seifter, S. 1990. Precipitation techniques. *Method in Enzymology*, 182: 285-300.
- Febrisiantosa, A., Purwanto, B.P., Arief, I.S., dan Widyastuti, Y. 2013. Karakteristik Fisik, Kimia, Mikrobiologi Whey Kefir dan Aktivitasnya terhadap Penghambatan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). *J. Teknol dan Industri Pangan*, 24 (2): 147-153.
- Girindra, A. 2000. *Biokimia I*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Gokgoz, M. dan Yigitoglu, M. 2011. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to Modified Carboxymethylcellulosef or Production of Ethanol. *Springer*, 34: 849-857.
- Groel, J.T., Tadros, S.S., Dreslinski, G.R., dan Jenkins, A.C. 1983. Long-Term Antihypertensive Therapy with Captopril. *Supp. III Hypertension*, 5 (5): 145-152.
- Hames, B.D. 1998. *Gel Electrophoresis of Protein: "A Practical Approach" Third Edition*. UK: Oxford University Press.
- Haslaniza, H., Maskat, M.Y., Aida, W.M.W., dan Mamot, S. 2010. The Effects of Enzyme Concentration, Temperature and Incubation Time on Nitrogen Content and Degree of Hydrolysis of Protein Precipitate from Cockle (*Anadara granosa*) Meat Wash Water. *Int. Food Res.*, 17: 147-152.

- Hoo, L.L. dan Babji, A.S. 2011. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) Skin by Alcalase. *Int. Food Res.*, 18 (4): 1359-1365.
- Homaei, A.A., Sariri, R., Vianello, F., dan Stevanato, R. 2013. Enzyme Immobilization: An Update. *J. Chem. Biol.*, 6: 185-205.
- Himonides, A.T., Taylor, A.K.D., dan Morris, A.J. 2011. A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames using Model Systems. *Food Nutr. Sci.*, 2: 575-585.
- Jain, V.K. 2005. *Fundamental of Plant Physiology*. New Delhi: S. Chand and Company Ltd.
- Ju, Z.Y., Hettiarachchy, N.S., dan Rath, N. 2001. Extraction, Denaturation, and Hydrophobic Properties of Rice Flour Proteins. *Food Sci.*, 66 (2): 229-232.
- Katchalski-Katzir, E. 1993. Immobilized Enzyme: Learning from Past Successes and Failures. *Dept. Membr. Res. Biophys.*, 11: 471-478.
- Kong, J. Dan Yu, S. 2007. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis Protein Secondary Structure. *Acta Biochem.*, 39 (8): 549-559.
- Lam, L.H., Shimamura, T., Manabe, S., Ishiyama, M., dan Ukeda, H. 2008. Assay of Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibiting Activity Based on the Detection of 3-Hydroxybutyrate with Water Soluble Tetrazolium Salt. *Anal. Sci.*, 24: 1057-1060.
- Laemmli, U.K. 1970. cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lumbantobing, S.M., 2008. *Tekanan Darah Tinggi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran.
- Manner, H.I. dan Elevitch, C.R. 2006. *Gnetum gnemon* (gnemon). Ver 1.1. In: Elevitch, C.r. (ed). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. Hawaii: Permanent Agricultur Resources (PAR): 1-9.
- Maqueda, D., Ledesma, B., Amigo, L., Miralles, B., dan Gomez-Ruiz, J.A. 2013. Extraction/Fractionation Techniques for Protein and Peptides and Protein Digestion. *Springer*, 10: 21-50.
- Moreno, S. 2002. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Schi Tech Int* 8 (3): 121-137.
- Muhamyankaka, V., Shoemaker, C.F., Nalwoga, M., dan Zhang, X.M. 2013. Physicochemical Properties of hydrolisates from Enzymatic hydrolysis of

- Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Protein Meals. *Int. Food Res.*, 20 (5): 2227-2240.
- Nielsen, S.S. 2003. *Introduction of Food Analysis*. Dalam S. Nielsen (Ed.). 2003. Food Analysis. Springer science. New york.
- NODC Taxonomic Code. 1996. Database (version 8.0). [serial on line]. (<http://www.itis.gov>). [7 maret 2016].
- Notoatmodjo, 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- O'Neill, M.L., Vrtus, R.N., Vincent, J.L., Lukas, A.S., Kawarcki, E.J., Peterson, B.K., dan Bitner, M.D. 2002. Optimized Materials Properties for Organosilicate Glasses Produced by Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition. *APCI*.
- Ortiz, S.E.M. dan Wagner, J.R.2002. Hydrolysates of Native and Modified Soy Protein Isolate: Structural Characteristics, Solubility and Foaming Properties. *Food Res. Int.*, 35: 511-518.
- Pace, C Nick, Saul Trevino, Erode Prabhakaran and J. Martin. 2004. Protein structure, Stability, and Solubility in Water and Other Solvents. Phil. Trans. R.Sac. Land. The Royal Society.
- Pereira, E.B., Zanin, G.M., dan Castro, H.F. 2003. Immobilization and Catalytic Properties of Lipase on Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reaction. *Braz. Chem. Eng.*, 20(4): 343-355
- Pinto A., Rol, R., dan Sollecito, T.P. 2005. Hypertension in Children: an Overview. *Dent. Educ.*, 70 (4): 434-440.
- Puspitaningrum, Y.T., Efendi, E., dan Siswoyo, T.A. 2013. Analisis In Vivo Aktivitas Antihipertensi dari Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*) Terhidrolisis. *Pustaka Kesehatan*, 2 (2): 327-331.
- Reetz, M.T, Tielmann, P., Wiesenhofer, W., Konen, W., dan Zonta, A. 2003. Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. *Adv. Synth. Catal.*, 345: 717-728.
- Salcedo-Chaves, B., Osuna-Castro, J.A., Guevara-Lara, F., Dominguez, J., dan Parades-Lopez, O. 2002. Optimization of Isoelectric Precipitation Method to Obtain Protein Isolates from Amaranth (*Amaranthus cruentus*) Seeds. *Agric. Food Chem.*, 50: 6515-6520.
- Sharifi, N., Sour, E., Zial, S.A., Amin, G., dan Amanlou, M.2013. Discovery of New Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitors from Medicinal

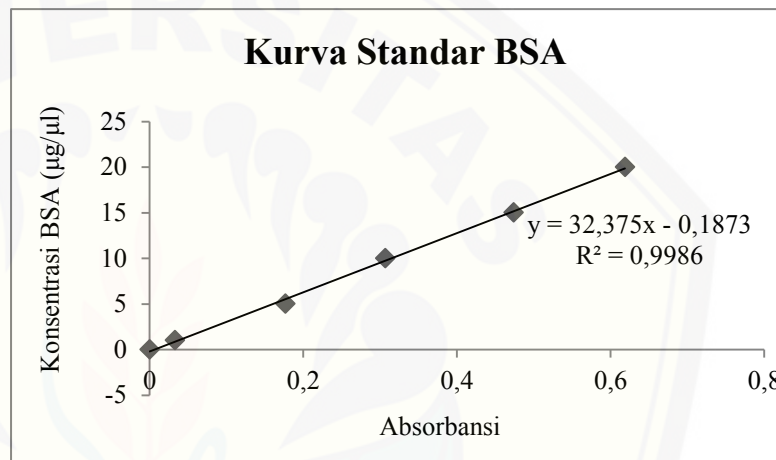
- Plants to Treat Hypertension using an In Vitro Assay. *J.Pharmaceutic. Sci.*, 21:1-8.
- Sembodo, T.A.P. 2015. Uji Aktivitas secara In vitro dan Kemampuan Proteksi terhadap Kerusakan DNA dari Protein Biji Melinjo (*Gnetum gnemon*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Siswoyo, T.A. dan Sugiharto, B. 2012. Produksi Pengembangan Protein Antihipertensi Generasi Baru dari Protein *Gnetum gnemon* sebagai Bahan Nutrasetik Komersial. *Prosiding InSINas*: 217-222.
- Siswoyo, T.A., Aldino, M., dan Hoshokawa. 2012. Free Radical Scavenging Activity and DNA Damage Protective Effect of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). *Med. Plant Res.Acad. J.*
- Siswoyo, T.A. dan Aldino, M. 2007. Free Radical Scavenging Activity and Phenolic Content of Melinjo Tree (*Gnetum gnemon* L.). *Int. Conf. Chem. Sci.*, Yogyakarta: UGM.
- Stoscheck, C.M. 1990. Increased Uniformity in the Response of the Coomassie Blue Protein Assay to Different Proteins. *Anal. Biochem.*, 18 (4): 111-116.
- Sudarmadji, S. 1989. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sukandar E.Y. 2006. *Alam Sumber Kesehatan, Manfaat dan Kegunaan*. Jakarta: Balai Pustaka.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia*. Jakarta: EGC.
- Taddei, S., Viridis, A., Ghiadoni, L., Sudano, I., dan Salvetti, A. 2002. *Effects of Antihypertensive Drugs on Endothelial Dysfunction*. *Drugs*, 62 (2): 265-284.
- Tardoli, P.W., Pedroche, J., Giordano, R.L.C., Lafuente, R.F., dan Guisan, J.M. 2003. Hydrolysis of Proteins by Immobilized-Stabilized Alcalase-Glyoxyl Agarose. *Biotechnol. Prog.*, 19: 352-360.
- Tovar-Perez, E.G., Guerrero-Legarreta, I., Farres-Gonzalez, A., dan Soriano-Santos, J. 2009. Angiotensin I-converting Enzyme-inhibitory Peptide Fractions from Albumin 1 and Globulin as obtained of Amaranth Grain. *Elsevier*. 116: 437-444.
- Vikrant, S. dan Tiwari, S.C. 2001. Essential Hypertension-Pathogenesis and Pathophysiology. *J. Indian Acad. Clinical. Med.*, 2 (3): 141-161.

- Wilson, K. dan Walker, J.M. 2000. *Principles and Technique in Practical Biochemistry, Fifth Edition*. UK:Cambridge University Press.
- Wulaningrum, N. 2013. Potensi Protein Antioksidan dari Biji dan Daun Tanaman Melinjo (*Gnetum gnemon*) pada Ketinggian Lokasi yang Berbeda. *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., dan Yang, B.2009. Effect of Degree of Hydrolysis on the Antioxidant Hydrolysates. *Innovative Food sci. Emerging Technol.*, 10: 235-240.
- Zarcula, C., Corici, L., Croitoru, R., Ursoiu,A., dan Peter, F. 2010. Preparation and properties of Xerogels Obtained by Ionic Liquid Incorporation during the Immobilization of Lipase by the Sol–Gel Method.*Elsevier*, 65: 79-86.
- Zhidong, L., Benheng, G., Xuezhong, C., Yun,D., Hongliang, H., dan Wen. R. 2013. Optimisation of Hydrolysis Conditions for Antioxidant Hydrolysate Production from Whey Protein Isolates using Response Surface Methodology. *Agric. Food Res.*, 52: 53-65.

LAMPIRAN A. Perhitungan Kandungan Protein Biji Melinjo

A.1 Standar BSA untuk Penentuan Protein Terlarut

Konsentrasi BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Hasil absorbansi
0	0
1	0,033
5	0,177
10	0,307
15	0,474
20	0,619



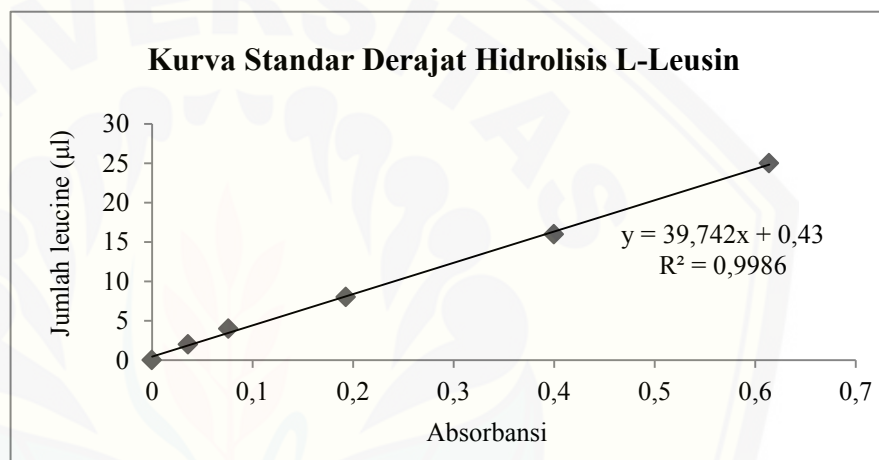
A.2 Hasil Pengukuran Konsentrasi Protein Terlarut

SAMPSEL	ABSORBANSI			KONSENTRASI ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)			RATA-RATA KONSENTRASI ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	STDEV (%)	VOLUME (ml)	JUMLAH PROTEIN (mg)
Gg-PK	0,968	1,001	1,014	6,230	6,444	6,528	6,401	0,154	42	268,842
Gg-PI	1,199	1,027	1,139	7,726	6,612	7,338	7,225	0,565	19	137,275
Gg-PH	0,428	0,42	0,425	2,734	2,682	2,714	2,710	0,026	11	29,81

LAMPIRAN B. Perhitungan Derajat Hidrolisis

B.1 Standar Derajat Hidrolisis dengan L-Leusin

Konsentrasi L-Leusin (µl)	Hasil absorbansi
0	0
2	0,036
4	0,076
8	0,193
16	0,4
25	0,614



B.2 Hidrolisis TotalGg-PH

SAMPSEL	ABSORBANSI			A-AMINO/µl			DERAJAT HIDROLISIS (%)			RATA-RATA DH (%)	STDEV (%)
Gg-PH	0,659	0,66	0,624	5,324	5,332	5,046	100	100	100	100	0,00

B.3 Hidrolisis Optimal Gg-PH

SAMPLER	ABSORBANSI			A-AMINO/ μ l			DERAJAT HIDROLISIS (%)			RATA-RATA (%)	STDEV (%)
Gg-PH	0,445	0,437	0,447	3,623	3,559	3,639	68,05	66,76	72,12	68,98	0,028

B.4 Hidrolisis Berulang Gg-PH

PENGGUNAAN KE-	ABSORBANSI			A-AMINO/ μ l			DERAJAT HIDROLISIS (%)			RATA-RATA (%)	STDEV (%)
1	0,447	0,443	0,449	3,639	3,607	3,655	68,35	67,65	72,43	69,48	0,026
2	0,292	0,292	0,291	2,407	2,407	2,399	45,21	45,14	47,54	45,97	0,014
3	0,161	0,162	0,153	1,366	1,374	1,302	25,65	25,76	25,81	25,74	0,001
4	0,102	0,095	0,104	0,897	0,841	0,913	16,84	15,77	18,09	16,90	0,012

LAMPIRAN C. Aktivitas *ACE inhibitor* Protein Biji Melinjo

SAMPSEL	KONSENTRASI ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABSORBANSI			ACE INHIBITOR (%)			RATA- RATA (%)	STDEV (%)
Gg-PI	0,0002	0,276	0,283	0,278	21,00	18,51	20,28	19,93	0,013
	0,002	0,27	0,268	0,275	23,13	23,84	21,35	22,78	0,013
	0,02	0,264	0,252	0,261	25,27	29,54	26,33	27,05	0,022
	0,2	0,236	0,243	0,241	35,23	32,74	33,45	33,81	0,013
	2	0,229	0,219	0,239	37,72	41,28	34,16	37,72	0,036
Gg-PH	0,0002	0,249	0,255	0,258	30,60	28,47	27,40	28,83	0,016
	0,002	0,231	0,23	0,232	37,01	37,37	36,65	37,01	0,004
	0,02	0,184	0,181	0,187	53,74	54,80	52,67	53,74	0,011
	0,2	0,156	0,152	0,154	63,70	65,12	64,41	64,41	0,007
	2	0,121	0,126	0,122	76,16	74,38	75,80	75,44	0,009
Gg-PHB (alkalase bebas)	0,0002	0,248	0,252	0,244	30,96	29,54	32,38	30,96	0,014
	0,002	0,201	0,231	0,225	47,69	37,01	39,15	41,28	0,056
	0,02	0,171	0,174	0,177	58,36	57,30	56,23	57,30	0,011
	0,2	0,143	0,141	0,148	68,33	69,04	66,55	67,97	0,013
	2	0,117	0,111	0,123	77,58	79,72	75,44	77,58	0,021
Kontrol positif (kaptopril)	0,0002	0,26	0,282	0,271	26,69	18,86	22,78	22,78	0,039
	0,002	0,181	0,199	0,217	54,80	48,40	41,99	48,40	0,064
	0,02	0,155	0,146	0,176	64,06	67,26	56,58	62,63	0,055
	0,2	0,108	0,136	0,119	80,78	70,82	76,87	76,16	0,050
	2	0,113	0,08	0,101	79,00	90,75	83,27	84,34	0,059
blanko 1		0,335	0,33	0,337					

blanko 2		0,054	0,063	0,054				
----------	--	-------	-------	-------	--	--	--	--

C.1 Perhitungan IC₅₀ Aktivitas ACE *inhibitor* Gg-PH, Gg-PHB, dan Kaptopril

SAMPSEL	KONSENTRASI ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	ABSORBANSI			ACE INHIBITOR (%)			RATA- RATA (%)	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Gg-PH	0,0002	0,249	0,255	0,258	30,60	28,47	27,40	28,83	2,457 \pm 0,213
	0,002	0,231	0,23	0,232	37,01	37,37	36,65	37,01	
	0,02	0,184	0,181	0,187	53,74	54,80	52,67	53,74	
	0,2	0,156	0,152	0,154	63,70	65,12	64,41	64,41	
	2	0,121	0,126	0,122	76,16	74,38	75,80	75,44	
Gg-PHB	0,0002	0,248	0,252	0,244	30,96	29,54	32,38	30,96	2,214 \pm 0,195
	0,002	0,201	0,231	0,225	47,69	37,01	39,15	41,28	
	0,02	0,171	0,174	0,177	58,36	57,30	56,23	57,30	
	0,2	0,143	0,141	0,148	68,33	69,04	66,55	67,97	
	2	0,117	0,111	0,123	77,58	79,72	75,44	77,58	
Kaptopril	0,0002	0,26	0,282	0,271	26,69	18,86	22,78	22,78	2,085 \pm 0,202
	0,002	0,181	0,199	0,217	54,80	48,40	41,99	48,40	
	0,02	0,155	0,146	0,176	64,06	67,26	56,58	62,63	
	0,2	0,108	0,136	0,119	80,78	70,82	76,87	76,16	
	2	0,113	0,08	0,101	79,00	90,75	83,27	84,34	

LAMPIRAN D. Analisis Data Statistik

D.1 Nilai IC₅₀ Gg-PH

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	.120	.068	.182	-.921	-1.169	-.739
0.02	.171	.103	.248	-.768	-.988	-.605
0.03	.214	.134	.302	-.670	-.873	-.520
0.04	.253	.164	.349	-.597	-.786	-.457
0.05	.290	.192	.394	-.537	-.716	-.405
0.06	.326	.221	.436	-.486	-.656	-.361
0.07	.362	.249	.477	-.442	-.604	-.322
0.08	.396	.277	.516	-.402	-.557	-.287
0.09	.431	.306	.555	-.366	-.514	-.255
0.1	.465	.335	.594	-.332	-.475	-.226
0.15	.639	.486	.785	-.194	-.313	-.105
0.2	.823	.654	.980	-.084	-.185	-.009
0.25	1.023	.841	1.187	.010	-.075	.075
0.3	1.242	1.054	1.412	.094	.023	.150
0.35	1.488	1.296	1.662	.173	.113	.221
0.4	1.766	1.572	1.946	.247	.197	.289
0.45	2.084	1.888	2.276	.319	.276	.357
0.5	2.454	2.246	2.672	.390	.351	.427
0.55	2.888	2.652	3.160	.461	.424	.500
0.6	3.409	3.118	3.774	.533	.494	.577
0.65	4.045	3.662	4.563	.607	.564	.659
0.7	4.845	4.320	5.599	.685	.636	.748
0.75	5.887	5.148	7.003	.770	.712	.845
0.8	7.313	6.242	9.007	.864	.795	.955
0.85	9.416	7.800	12.097	.974	.892	1.083
0.9	12.943	10.309	17.561	1.112	1.013	1.245
0.91	13.976	11.026	19.219	1.145	1.042	1.284
0.92	15.192	11.860	21.199	1.182	1.074	1.326
0.93	16.653	12.849	23.613	1.221	1.109	1.373
0.94	18.450	14.051	26.639	1.266	1.148	1.426

0.95	20.737	15.559	30.567	1.317	1.192	1.485
0.96	23.790	17.537	35.931	1.376	1.244	1.555
0.97	28.165	20.314	43.837	1.450	1.308	1.642
0.98	35.252	24.694	57.112	1.547	1.393	1.757
0.99	50.211	33.585	86.676	1.701	1.526	1.938

a. Logarithm base = 10.

D.2 Nilai IC₅₀ Gg-PHB

Confidence Limits

Probability	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^a		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT 0.01	.116	.066	.175	-.937	-1.180	-.757
0.02	.163	.099	.237	-.787	-1.004	-.626
0.03	.203	.128	.287	-.692	-.892	-.543
0.04	.240	.156	.331	-.620	-.807	-.480
0.05	.274	.182	.372	-.561	-.739	-.429
0.06	.308	.209	.411	-.512	-.681	-.386
0.07	.340	.235	.449	-.468	-.630	-.348
0.08	.372	.261	.486	-.429	-.584	-.314
0.09	.404	.287	.521	-.394	-.543	-.283
0.1	.435	.313	.557	-.361	-.504	-.254
0.15	.594	.450	.732	-.226	-.346	-.136
0.2	.761	.601	.910	-.119	-.221	-.041
0.25	.940	.769	1.097	-.027	-.114	.040
0.3	1.138	.958	1.300	.056	-.019	.114
0.35	1.357	1.173	1.524	.133	.069	.183
0.4	1.605	1.418	1.776	.205	.152	.249
0.45	1.887	1.699	2.066	.276	.230	.315
0.5	2.214	2.020	2.409	.345	.305	.382
0.55	2.596	2.386	2.826	.414	.378	.451
0.6	3.053	2.806	3.348	.485	.448	.525
0.65	3.610	3.295	4.016	.557	.518	.604
0.7	4.307	3.883	4.890	.634	.589	.689
0.75	5.210	4.618	6.073	.717	.664	.783
0.8	6.441	5.584	7.751	.809	.747	.889
0.85	8.248	6.954	10.324	.916	.842	1.014

0.9	11.257	9.146	14.835	1.051	.961	1.171
0.91	12.136	9.770	16.196	1.084	.990	1.209
0.92	13.168	10.496	17.817	1.120	1.021	1.251
0.93	14.404	11.355	19.790	1.158	1.055	1.296
0.94	15.923	12.397	22.253	1.202	1.093	1.347
0.95	17.852	13.702	25.441	1.252	1.137	1.406
0.96	20.418	15.410	29.779	1.310	1.188	1.474
0.97	24.083	17.801	36.141	1.382	1.250	1.558
0.98	29.995	21.562	46.758	1.477	1.334	1.670
0.99	42.392	29.157	70.189	1.627	1.465	1.846

a. Logarithm base = 10.

D.3 Nilai IC₅₀ Kaptopril

Confidence Limits

Proba bility	95% Confidence Limits for konsentrasi			95% Confidence Limits for log(konsentrasi) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a 0.01	.218	.133	.312	-.661	-.875	-.506
0.02	.284	.183	.392	-.546	-.738	-.407
0.03	.336	.223	.453	-.473	-.652	-.344
0.04	.381	.259	.505	-.419	-.586	-.297
0.05	.423	.293	.552	-.374	-.533	-.258
0.06	.461	.325	.596	-.336	-.488	-.225
0.07	.498	.356	.637	-.303	-.449	-.196
0.08	.533	.386	.676	-.273	-.413	-.170
0.09	.568	.416	.713	-.246	-.381	-.147
0.1	.601	.445	.750	-.221	-.351	-.125
0.15	.763	.590	.923	-.118	-.229	-.035
0.2	.922	.737	1.089	-.035	-.132	.037
0.25	1.084	.892	1.256	.035	-.050	.099
0.3	1.254	1.057	1.430	.098	.024	.155
0.35	1.435	1.236	1.614	.157	.092	.208
0.4	1.631	1.431	1.814	.213	.156	.259

0.45	1.847	1.645	2.035	.266	.216	.309
0.5	2.086	1.882	2.286	.319	.275	.359
0.55	2.357	2.145	2.578	.372	.331	.411
0.6	2.668	2.438	2.925	.426	.387	.466
0.65	3.032	2.770	3.350	.482	.443	.525
0.7	3.471	3.154	3.883	.540	.499	.589
0.75	4.015	3.613	4.573	.604	.558	.660
0.8	4.722	4.187	5.507	.674	.622	.741
0.85	5.705	4.959	6.858	.756	.695	.836
0.9	7.237	6.118	9.065	.860	.787	.957
0.91	7.665	6.434	9.699	.885	.808	.987
0.92	8.159	6.796	10.440	.912	.832	1.019
0.93	8.739	7.216	11.322	.941	.858	1.054
0.94	9.435	7.716	12.396	.975	.887	1.093
0.95	10.297	8.326	13.747	1.013	.920	1.138
0.96	11.411	9.105	15.527	1.057	.959	1.191
0.97	12.947	10.160	18.037	1.112	1.007	1.256
0.98	15.314	11.752	22.018	1.185	1.070	1.343
0.99	19.952	14.777	30.162	1.300	1.170	1.479

a. A heterogeneity factor is used.

b. Logarithm base = 10.

D.4 Uji Normalitas

Tests of Normality

sampel	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IC50 Gg-PH	.177	3	.	1.000	3	.974
Gg-PHB	.175	3	.	1.000	3	.997
Kaptopril	.260	2	.			

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa data normal ($p > 0,05$).

D.5 Uji Homogenitas

Zest of Homogeneity of VariancesIC₅₀

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.010	2	6	.990

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa data homogen ($p > 0,05$), sehingga dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA.

D.6 Uji ANOVA Satu Arah

ANOVA

IC ₅₀	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.215	2	.107	2.597	.154
Within Groups	.248	6	.041		
Total	.463	8			

Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p > 0,05$).

D.7 Uji Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

IC₅₀

LSD

(I) sampel	(J) sampel	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Gg-PH	Gg-PHB	.243000	.166007	.194	-.16321	.64921
	Kaptopril	.372667	.166007	.066	-.03354	.77887
Gg-PHB	Gg-PH	-.243000	.166007	.194	-.64921	.16321
	Kaptopril	.129667	.166007	.464	-.27654	.53587
Kaptopril	Gg-PH	-.372667	.166007	.066	-.77887	.03354
	Gg-PHB	-.129667	.166007	.464	-.53587	.27654

Lampiran E. Komposisi Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

E.1 Komposisi buffer fosfat pH 8

0,2 M NaH ₂ PO ₄	5,3 ml
0,2 M Na ₂ HPO ₄ , 7H ₂ O	94,7 ml
Akuades	sampai 200 ml

E.2 Komposisi pereaksi Bradford

CBBG-250	100 mg
Etanol 95%	50 ml
Asam fosfat 85%	100 ml
Akuades	sampai 1000 ml

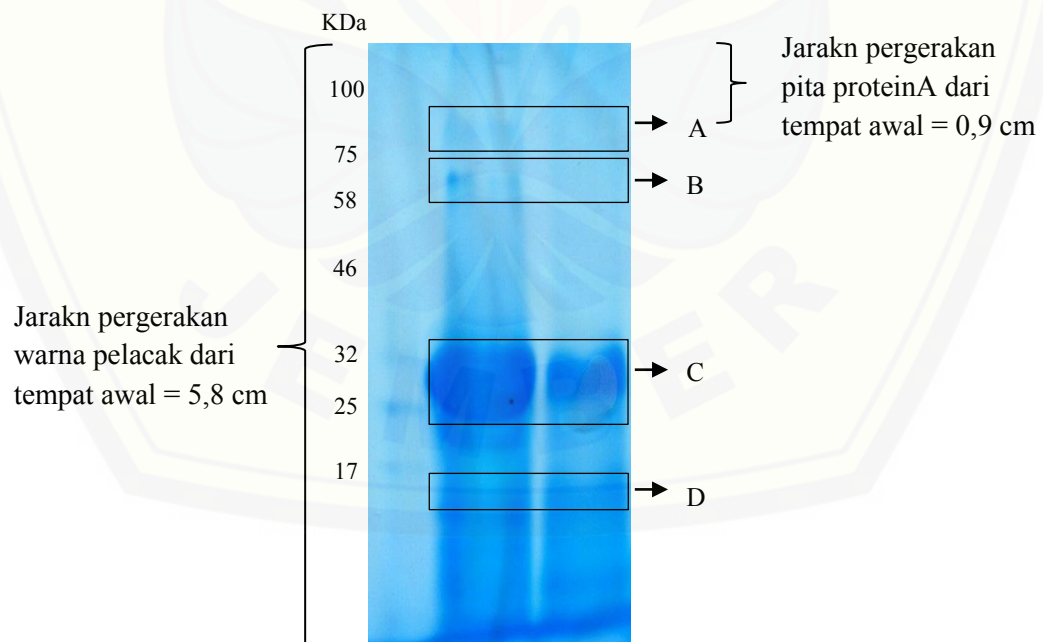
E.3 Komposisi SDS-PAGE

3.1	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
-----	-----------------------

	Tris base	18,2 g
	pH diatur sampai 8,8 menggunakan HCl	
	Akuades	sampai 100 ml
3.2	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	
	Tris base	6,1 g
	pH diatur sampai 6,8 menggunakan HCl	
	Akuades	sampai 100 ml
3.3	Akrilamida (30% T, 2% C)	
	Akrilamid	29,2 g
	Bisakrilamid	2,5 ml
	Akuades	sampai 100 ml
3.4	<i>Separating gel</i> 15%	
	Akrilamida (30% T, 2% C)	5 ml
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
	TEMED	5 μ l
	APS 10%	50 μ l
	Akuades	2,445 ml
3.5	<i>Stacking gel</i>	
	Akrilamida (30% T, 2% C)	0,45 ml
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,75 ml
	TEMED	4,5 μ l
	APS 10%	15 μ l
	Akuades	1,8 ml
3.6	Stok sampel buffer	
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,2 ml
	Gliserol	1 ml
	SDS 10%	2 ml
	0,5% <i>Bromofenol blue</i>	0,5 ml
	Akuades	4,8 ml
3.7	Sampel buffer	
	2-merkaptotanol	5 μ l

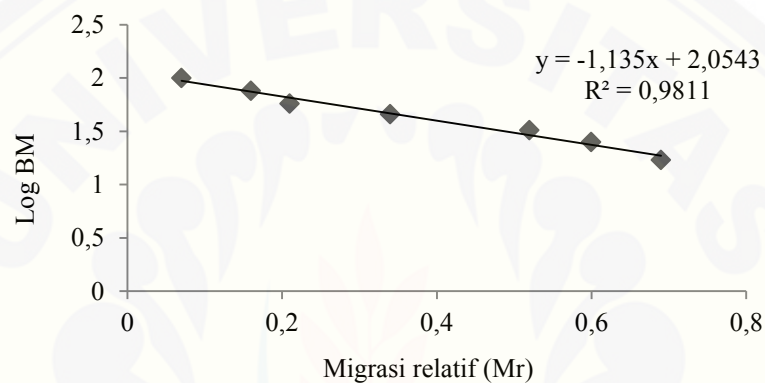
Stok sampel buffer	95 μ l
3.8 <i>Running buffer</i>	
0,025 M Tris base	0,3 g
0,192 M Glisin	1,4 g
0,1% (b/v) SDS	1 ml
Akuades	sampai 100 ml
3.9 <i>Larutan staining</i>	
CBBR-250	0,1 g
Metanol	40 ml
Asam asetat	10 ml
Akuades	sampai 100 ml
3.10 <i>Larutan destaining</i>	
Metanol	40 ml
Asam asetat	10 ml
Akuades	sampai 100 ml

LAMPIRAN F. Pengukuran Berat Molekul Protein



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

Kurva standar berat molekul



Perhitungan berat molekul protein biji melinjo

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

Contoh perhitungan pita protein A:

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

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

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

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

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

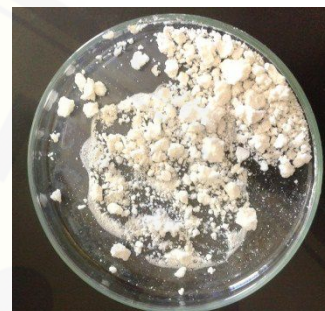
BM pita A: antiLog y maka antiLog 1,88 yaitu 76

Jadi berat molekul pita A adalah 76 KDa

LAMPIRAN G. Dokumentasi Penelitian



Biji melinjo



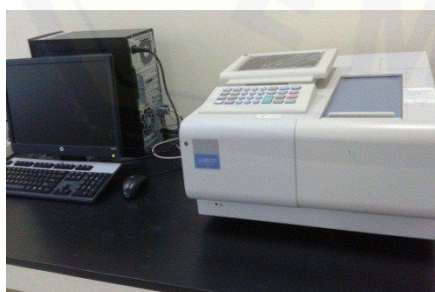
Enzim alkalase terimobilisasi



Waterbath



Sentrifus Hitachi CF15AXZ



Spektrofotometer UV-Vis



Elektroforesis SDS-PAGE



