



**KARAKTERISASI PROTEIN ANTIOKSIDAN BIJI MELINJO  
(*Gnetum gnemon* L.) SEBAGAI BAHAN NUTRACEUTICAL  
PADA FASE GENERATIF**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1)  
dan memperoleh gelar Sarjana Pertanian

Oleh

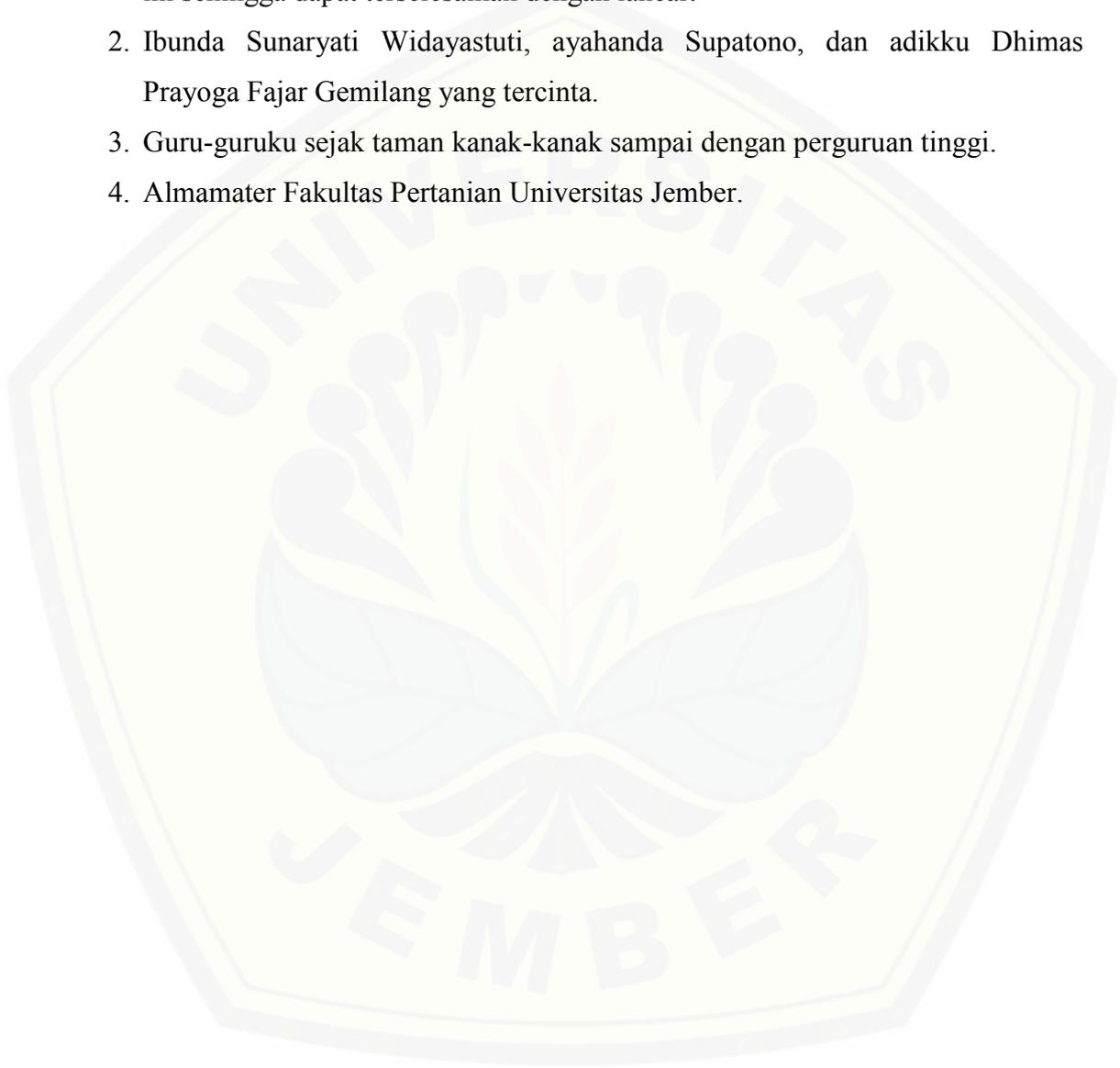
**Dhimas Singgih Priyo Utomo  
NIM 121510501091**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2017**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT atas segala karunia dan limpahan rahmat dalam penulisan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan dengan lancar.
2. Ibunda Sunaryati Widayastuti, ayahanda Supatono, dan adikku Dhimas Prayoga Fajar Gemilang yang tercinta.
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi.
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.



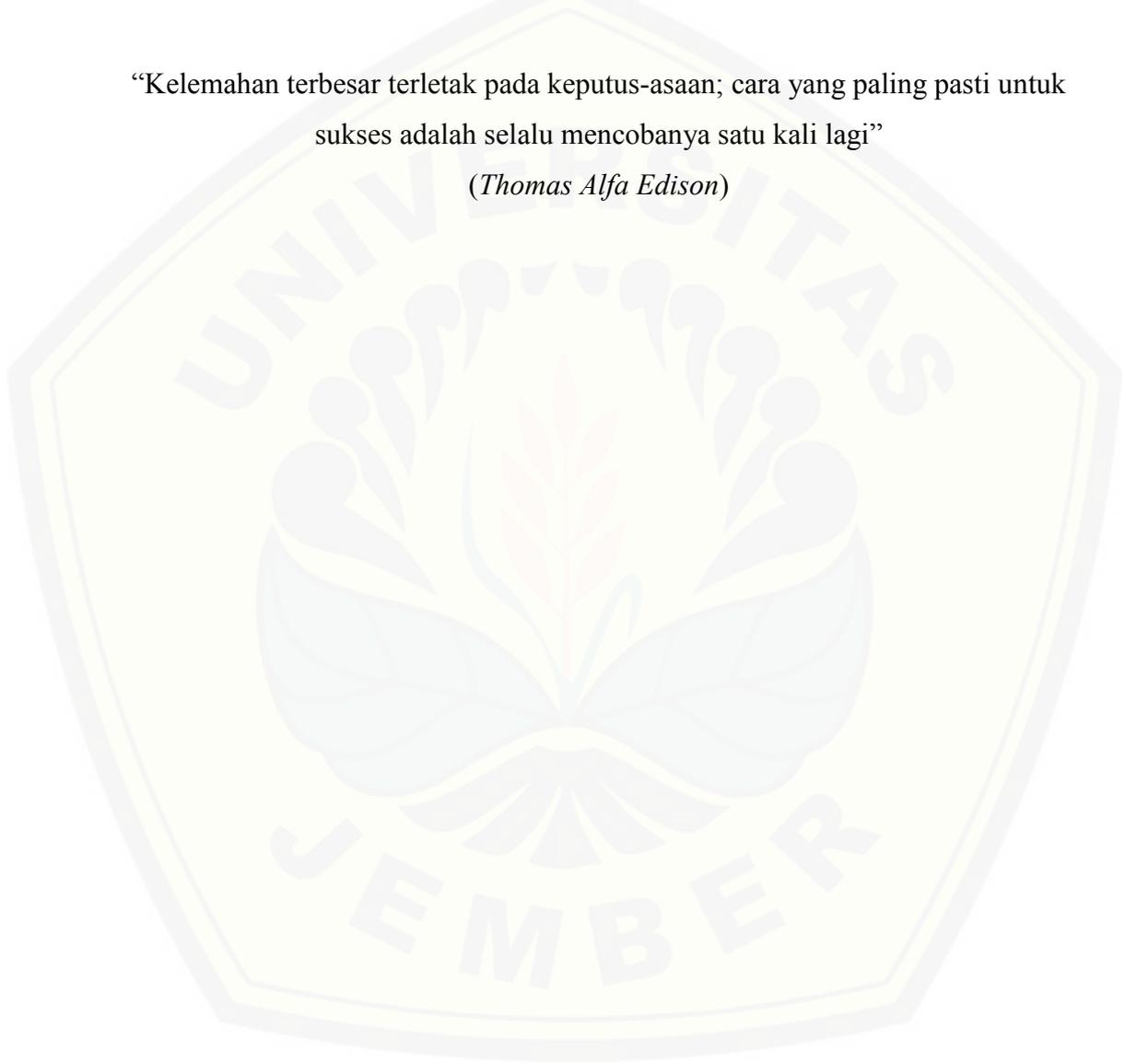
**MOTTO**

“Jika kamu tidak tahan terhadap penatnya belajar, maka kamu akan menanggung  
bahayanya kebodohan”

*(Imam Syafi'i)*

“Kelemahan terbesar terletak pada keputus-asaan; cara yang paling pasti untuk  
sukses adalah selalu mencobanya satu kali lagi”

*(Thomas Alfa Edison)*



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dhimas Singgih Priyo Utomo

NIM : 121510501091

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Karakterisasi Protein Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Sebagai Bahan *Nutraceutical* pada Fase Generatif”** 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 dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 27 Juli 2017  
yang menyatakan,

Dhimas Singgih Priyo Utomo  
NIM. 121510501091

**SKRIPSI**

**KARAKTERISASI PROTEIN ANTIOKSIDAN BIJI MELINJO  
(*Gnetum gnemon* L.) SEBAGAI BAHAN *NUTRACEUTICAL*  
PADA FASE GENERATIF**

Oleh

**Dhimas Singgih Priyo Utomo  
NIM 121510501091**

**Pembimbing:**

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

Pembimbing Anggota : Ir. Anang Syamsunihar, MP., Ph.D.  
NIP 196606261991031002

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Protein Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Sebagai Bahan *Nutraceutical* pada Fase Generatif” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 27 Juli 2017

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

Ir. Anang Syamsunihar, MP., Ph.D.  
NIP 196606261991031002

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Dr. Ir. Miswar, M.Si.  
NIP 196410191990021002

Wahyu Indra Duwi Fanata, SP., M.Sc., Ph.D.  
NIP 198102042015041001

Mengesahkan

Dekan,

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D.  
NIP 196005061987021001

## RINGKASAN

**Karakterisasi Protein Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Sebagai Bahan *Nutraceutical* pada Fase Generatif**; Dhimas Singgih Priyo Utomo, 121510501091; 2017; 41 halaman; Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) menjadi salah satu tanaman favorit di Indonesia karena bijinya yang dapat diolah menjadi kerupuk ataupun emping. Biji melinjo yang memiliki kandungan bioaktif protein tinggi (9-10) % yang diyakini memiliki potensi untuk dapat dikembangkan sebagai bahan dasar *nutraceutical* komersial yang berbasis protein. Biji melinjo memiliki beberapa tahap fase perkembangan mulai dari biji muda hingga biji berwarna merah yang dapat dibedakan dengan cara menggunakan kulit luar (eksokarp). Tujuan dari penelitian adalah untuk memperoleh informasi mengenai penentuan masa panen yang tepat untuk menghasilkan bioaktif protein tinggi yang digunakan sebagai bahan dasar suplemen (*nutraceutical*) komersial.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Jember pada bulan Agustus 2016 hingga Maret 2017. Penelitian ini menggunakan sampel melinjo berdasarkan fase generatif yakni bunga (strobilus) jantan dan betina, biji muda, biji berwarna hijau, hijau kekuningan, kuning kehijauan, kuning, kuning kemerahan, dan merah dengan mengukur kandungan total protein terlarut, aktivitas antioksidan dengan metode ABTS, elektroforesis SDS-PAGE, dan fraksinasi menggunakan FPLC.

Hasil penelitian menunjukkan total kandungan protein terlarut tertinggi sebesar 6,32 mg/g pada fase hijau. Pengujian aktivitas peredaman menggunakan metode ABTS dengan nilai persen peredaman tertinggi sebesar 66,5 % pada fase hijau. Pengukuran pola pita protein dengan tiga pola dengan berat molekul berbeda  $\pm 65$  kDa,  $\pm 30$  kDa, dan  $\pm 14$  kDa. Hasil pengukuran fraksinasi biji melinjo fase hijau menggunakan FPLC diperoleh fraksi tertinggi pada fraksi keempat, kemudian hasil fraksinasi dianalisis menggunakan metode ABTS untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan hasil menunjukkan persen aktivitas sebesar 44,0 % pada fraksi keempat.

## SUMMARY

**Characterization of Melinjo Seed (*Gnetum gnemon* L.) Antioxidant Protein As a *Nutraceutical* in Generative Phase;** Dhimas Singgih Priyo Utomo, 121510501091; 2017; 41 pages; Departement of Agrotechnology Faculty of Agriculture University of Jember.

Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) become one of the favorite plants in Indonesia because the seeds that can be processed into crackers or chips. Melinjo seeds have a high protein bioactive content (9-10) % which is believed to have the potential to be developed as a protein based material for commercial *nutraceutical*. Melinjo seeds have several stages of developmental phase ranging from young seeds to red seeds that can be distinguished by using the skin outside (exokarp). The aim of the study was to obtain information on the determination of appropriate harvests to produce high protein bioactives used as commercial (nutraceutical) ingredients.

This research was conducted at Plant Analysis Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Jember from August 2016 to March 2017. This study used a melinjo sample based on generative phases of male and female flowers (strobilus), young seed, green seed, yellowish green, greenish yellow, yellow, reddish yellow and red by measuring total dissolved protein content, antioxidant activity using ABTS method, SDS-PAGE electrophoresis, and fractionation using FPLC.

The results showed that the highest total dissolved protein content of 6,32 mg/g in the green phase. Damping activity test using ABTS method with highest damping percent value of 66,5 % in green phase. The measurement of protein banding pattern obtained three patterns with different molecular mass that are  $\pm 65$  kDa,  $\pm 30$  kDa, and  $\pm 14$  kDa. The result of green seed fractionation measurement using FPLC obtained the highest fraction found in fourth fraction, then the results of fractionation were analyzed using ABTS method to know the antioxidant activity and the result showed the activity percentage of 44,0 % in the fourth fraction.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT. Atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi berjudul “**Karakterisasi Protein Antioksidan Biji Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) Sebagai Bahan *Nutraceutical* pada Fase Generatif**”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

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

1. Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
2. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC. selaku Ketua Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
3. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dengan penuh kesabaran memberi banyak pengarahan dalam penyelesaian skripsi ini;
4. Ir. Anang Syamsunihar, MP., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota dengan ketekunan dan kesabarannya dalam meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini;
5. Dr. Ir. Miswar, M.Si., dan Wahyu Indra Duwi Fanata, SP., M.Sc., Ph.D., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik, saran, dan masukan dalam penyelesaian skripsi ini;
6. Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
7. Teman-teman agroteknologi angkatan 2012 khususnya kelas B yang telah memberikan dorongan dan doanya demi terselesaikannya skripsi ini serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang turut serta membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini;

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

Jember, 27 Juli 2017

Penulis



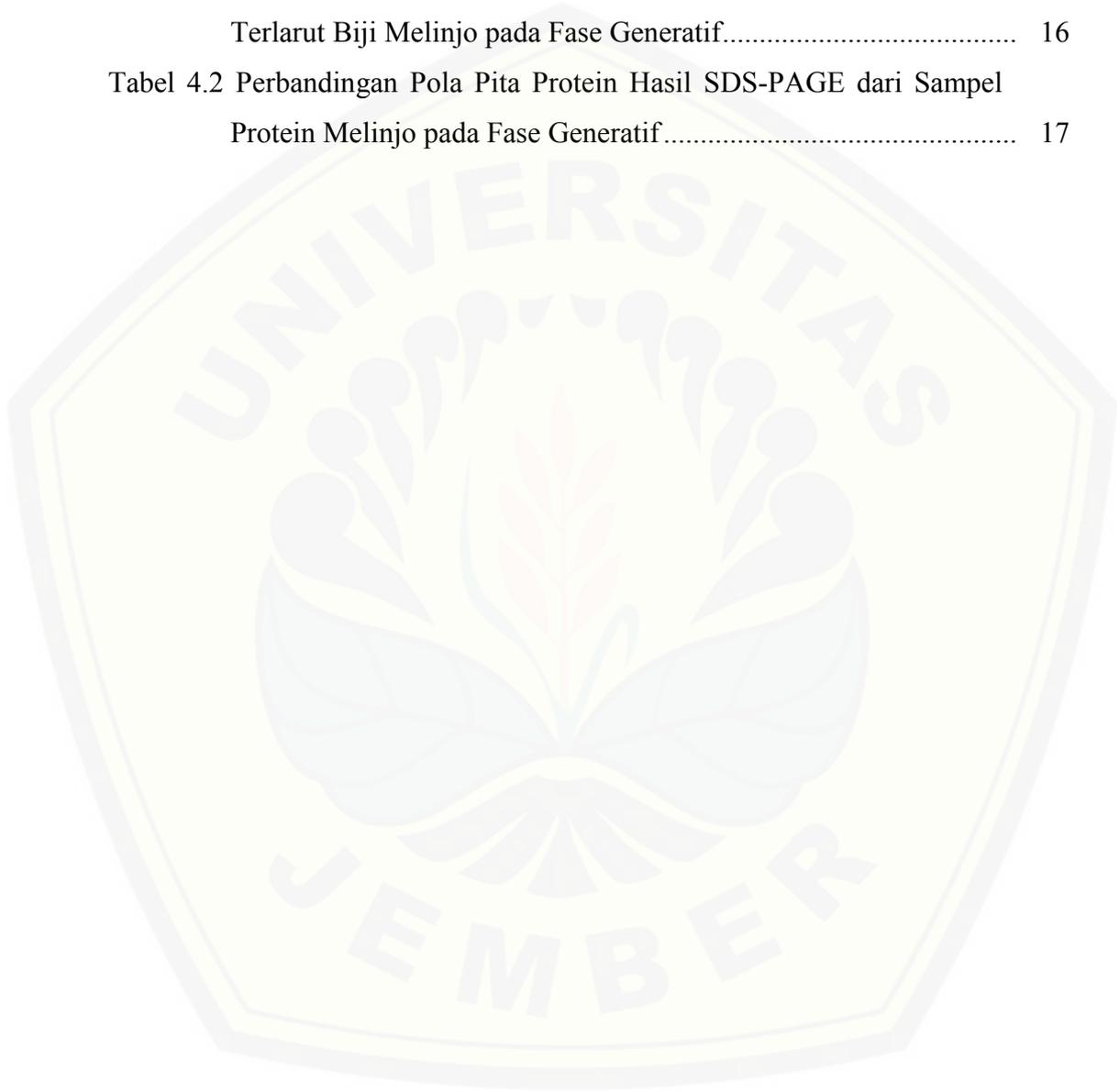
**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>SUMMARY</b> .....	viii
<b>PRAKARTA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan .....	3
1.4 Manfaat .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Melinjo ( <i>Gnetum gnemon</i> L.) .....	4
2.2 Protein Antioksidan .....	7
2.3 Hipotesis .....	11
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	12
3.1 Waktu dan Tempat .....	12
3.2 Bahan dan Alat .....	12
3.3 Pelaksanaan Penelitian .....	12
3.3.1 Ekstraksi Protein .....	13

3.3.2 Pengukuran Total Protein Perlarut.....	13
3.3.3 Penentuan Pola Pita Protein.....	13
3.3.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan.....	14
3.3.5 Fraksinasi Protein Antioksidan.....	14
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>16</b>
4.1 Hasil.....	16
4.2 Pembahasan.....	20
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>29</b>
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran.....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>35</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4.1 Perubahan Fisik, Berat, Panjang, Diameter dan Total Protein Terlarut Biji Melinjo pada Fase Generatif.....	16
Tabel 4.2 Perbandingan Pola Pita Protein Hasil SDS-PAGE dari Sampel Protein Melinjo pada Fase Generatif.....	17

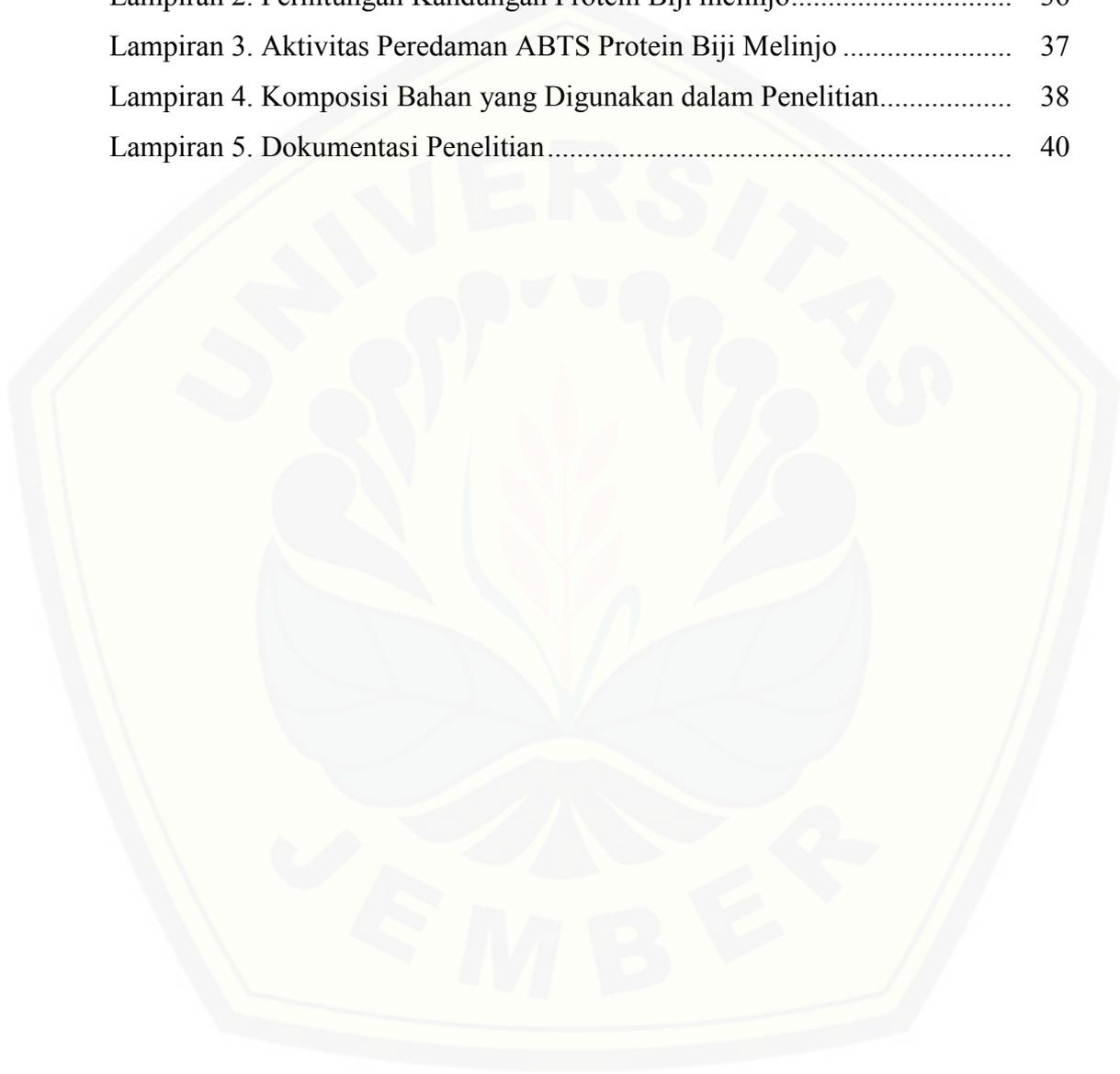


**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1 Biji Melinjo .....	5
Gambar 2.2 Strobilus Jantan (a), Strobilus Betina (b) .....	7
Gambar 4.1 Pola Perubahan Pita Protein menggunakan 15% SDS-PAGE .....	17
Gambar 4.2 Persentase Aktivitas Peredaman ABTS Fase Generatif.....	18
Gambar 4.3 Kromatogram FPLC Protein Antioksidan Fase Hijau.....	19
Gambar 4.4 Persentase Aktivitas Peredaman ABTS Fraksinasi Fase Hijau.....	19
Gambar 4.5 Fase Generatif Melinjo.....	20
Gambar 4.6 Biji Melinjo dalam Satu Tangkai .....	21

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1. Sampel Ekstraksi Protein Antioksidan .....	35
Lampiran 2. Perhitungan Kandungan Protein Biji melinjo.....	36
Lampiran 3. Aktivitas Peredaman ABTS Protein Biji Melinjo .....	37
Lampiran 4. Komposisi Bahan yang Digunakan dalam Penelitian.....	38
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.....	40



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman melinjo (*Gnetum gnemon* L.) banyak dibudidayakan di Asia salah satunya adalah Indonesia, tanaman melinjo memiliki banyak manfaat yaitu untuk dikonsumsi yang diolah menjadi tepung melinjo. Di Indonesia melinjo menjadi tanaman favorit karena bijinya yang dapat diolah menjadi kerupuk ataupun emping, dimana sebelumnya biji ditumbuk kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari sebelum digoreng (Siswoyo, 2006). Melinjo termasuk dalam jenis tumbuhan berbiji terbuka (*gymnospermae*) yaitu tumbuhan yang menghasilkan biji dalam keadaan tidak tertutup oleh daging buah itu sendiri, sehingga tampak dari luar mulai dari bakal biji hingga menjadi biji. Sedangkan untuk ciri lainnya adalah memiliki alat reproduksi berbentuk strobilus (karangan bunga berbentuk kerucut) serta pola percabangan batang dengan poros tumbuh lurus (monopolidial).

Biji melinjo diketahui banyak mengandung bioaktif yang bermanfaat untuk kesehatan baik secara makromolekuler berupa protein maupun mikromolekuler berupa fenolik dan flavonoid. Biji melinjo dapat berfungsi sebagai antioksidan dan antihipertensi, serta manfaat lain yang terkandung di dalamnya. Pada biji melinjo ditemukan dua fraksi protein yang memiliki aktivitas antioksidan untuk menangkal radikal bebas (Siswoyo *et al.*, 2011). Biji yang sering digunakan sebagai bahan penelitian adalah biji melinjo yang memiliki kulit luar (eksokarp) berwarna merah. Biji terbentuk dari proses polinasi antara strobilus jantan dan betina. Strobilus yang telah mengalami penyerbukan pada tanaman *gymnospermae* akan berubah menjadi zigot kemudian embrio dan menjadi biji (Darmawan dan Baharsjah, 2010). Biji melinjo memiliki beberapa tahapan perkembangan biji dengan warna kulit yakni hijau, kuning, dan merah. (Mulyanto, 2003).

Protein sangat berperan penting dalam meningkatkan kualitas bahan pangan. Pada tumbuhan protein terbagi menjadi beberapa bentuk salah satunya adalah pada biji. Komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari pati 58 %, lemak

16,4 %, protein (9-10) %, dan fenolik 1 %. Kandungan protein yang tinggi yakni (9-10) % pada biji melinjo diyakini memiliki potensi untuk dapat dikembangkan sebagai bahan dasar *nutraceutical* komersial yang berbasis protein (Siswoyo dan Sugiharto, 2012).

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (electron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan mampu mengikat radikal bebas sehingga oksidasi dapat dihambat (Winarsi, 2005). Antioksidan adalah zat yang dapat melawan radikal bebas yang terbentuk dari hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh. Antioksidan memiliki fungsi untuk menghentikan atau memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh, sehingga dapat menyelamatkan sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas. Antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dengan cara memberikan satu elektronnya kepada radikal bebas, sehingga menjadi non radikal (Rohmatussolihat, 2009).

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi dua bagian, yaitu antioksidan enzimatis dan non enzimatis. Antioksidan enzimatis contohnya seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan *glutathione* (G-SH). Antioksidan non enzimatis terbagi menjadi dua kelompok yaitu antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon dan bilirubin serta antioksidan larut air seperti asam askorbat (vitamin C), dan protein pengikat logam (Winarsi, 2005). Sistem enzim tersebut berfungsi menetralkan radikal bebas sehingga mampu mengurangi kerusakan sel.

Tubuh memiliki berbagai mekanisme pertahanan untuk menetralkan radikal bebas. Mekanisme ini berfungsi untuk mencegah kerusakan sel akibat adanya reaksi radikal bebas, diantaranya dapat berupa superoksida dismutase (SOD), *glutathione* (G-SH), dan katalase (Kumar *et al.*, 2015). Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan komponen sel seperti lemak, protein, dan DNA. Stress oksidatif akibat reaksi rantai radikal bebas memicu nekrosis sel yang dapat menginduksi kerusakan jaringan disekitarnya. Kerusakan ini dapat menyerang

berbagai macam jaringan dan organ sehingga menyebabkan perubahan struktur dan fungsi sel yang berujung pada berbagai penyakit seperti kanker, penyakit arteri (arteriosklerosis), jantung, dan stroke, penyakit gusi (*periodontitis*), dan penyakit infeksi (inflamasi) kronis lainnya (Guyton and Hall, 2006; Birben *et al.*, 2012).

Penelitian ini dilaksanakan dengan menganalisa kandungan total protein tertalut, aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode peredaman *2,2'-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS), elektroforesis *sodium dedocyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) untuk mengetahui pola protein, dan fraksinasi untuk memisahkan jenis protein berdasarkan berat molekul. Perubahan kandungan bioaktif protein antioksidan pada fase generatif belum banyak diteliti. Oleh karena itu, perlu adanya analisa tentang perubahan kandungan bioaktif protein pada biji, sehingga dapat menjadi informasi tentang penentuan masa panen tepat, yang berfungsi sebagai bahan dasar suplemen (nutraceutical).

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian yang telah disebutkan di atas, maka rumusan permasalahan dalam penelitian ini adalah apakah terjadi perubahan kandungan bioaktif protein pada setiap fase perkembangan organ reproduktif melinjo beserta aktivitas antioksidannya.

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dari penelitian yang dilakukan yaitu untuk mengetahui kandungan bioaktif protein antioksidan melinjo berdasarkan fase generatif.

## **1.4 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan mampu menjadi informasi dalam menentukan masa panen yang tepat organ reproduktif melinjo untuk dapat dikembangkan sebagai bahan dasar suplemen (nutraceutical) pada fase generatif.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Melinjo (*Gnetum gnemon* L.)

Melinjo merupakan tumbuhan yang termasuk dalam divisi *spermatophyta* yang dapat ditemukan di Pulau Jawa. Melinjo mempunyai bentuk pohon yang ramping, memiliki alat reproduksi yang terpisah pada pohon berbeda, dengan batang yang lurus, dengan tinggi (5-10) m kulit batangnya berwarna kelabu yang ditandai oleh gelang-gelang menonjol secara nyata, cabang pohon melinjo terdiri dari berbagai ukuran dan letaknya yang melingkari batang sampai ke pangkal batang. Daun melinjo memiliki posisi yang berhadapan dengan bentuk jorong berukuran lebar (4-7) cm dan panjang (10-20) cm berwarna hijau gelap, mengkilap, tulang daun melengkung dan bersatu di ujungnya. Biji melinjo berbentuk ellipsoid, berkulit tipis, dengan panjang (1-3,5) cm sedangkan lebarnya setengah dari ukuran panjang biji, berubah dari hijau, hijau kekuningan, kuning kehijauan, kuning, kuning kemerahan, dan merah (Rahardja, 2002).

Melinjo dapat tumbuh subur di daerah tropis, kering sampai lembab pada ketinggian (0-1200 mdpl). Tumbuhan ini tumbuh dengan baik pada daerah dengan curah hujan (3000-5000) mm per tahun, meskipun juga dapat bertahan hidup pada curah hujan (750-1000) mm per tahun (Cadiz and Florido, 2001; Lim, 2012). Melinjo tidak memerlukan tanah yang bernutrisi tinggi atau iklim khusus untuk tumbuh dan berkembang (Mulyanto, 1995; Tampubolon, 2013). Melinjo dapat tumbuh pada jenis tanah yang beragam seperti berpasir, tanah liat maupun tanah berkapur, tetapi akan lebih subur pada tanah yang relatif netral dengan curah hujan yang baik.

Tanaman melinjo memiliki dua jenis bunga yakni bunga jantan dan bunga betina. Bunga jantan memiliki bulir bunga yang lebih kecil, sedangkan untuk bulir bunga betina memiliki tonjolan bakal biji. Strobilus jantan pada tanaman melinjo memiliki banyak tepung sari yang dapat menyerbuki tanaman betina menggunakan bantuan angin maupun serangga. Tanaman melinjo termasuk dalam golongan tanaman yang berumah satu, namun di Jawa Tengah dan Jawa Barat ditemukan tanaman melinjo yang *hermaphrodite* atau dalam satu pohon memiliki

dua alat reproduksi (strobilus) yakni jantan dan betina. Pohon jantan dan betina dapat dibedakan dari jenis *strobilus* yang tumbuh, dan dapat dibedakan dari daunnya. Daun dari tanaman betina memiliki pangkal bundar dan lebih lebar dibandingkan dengan daun tanaman jantan (Sunarto, 1991). Morfologi biji melinjo ditunjukkan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Biji Melinjo

Melinjo termasuk dalam famili *gnetaceae* yang tergolong tanaman berbiji terbuka (*gymnospermae*). Tanaman melinjo dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tumbuhan berbiji ( <i>spermatophyta</i> )
Sub Divisi	: Berbiji terbuka ( <i>gymnospermae</i> )
Kelas	: Gnetopsida
Ordo	: Gnetales
Famili	: Gnetaceae
Genus	: <i>Gnetum</i>
Spesies	: <i>Gnetum gnemon</i> L.

Pada tanaman melinjo buah yang kita lihat bukanlah buah sejati, yang dianggap sebagai buah sebenarnya adalah biji yang terbungkus oleh lapisan eksokarp, mesokarp, dan endokarp, mempunyai kulit yang berwarna hijau, kuning, merah (Tampubolon, 2013). Melinjo merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat. Daun muda, bunga, dan biji melinjo dapat diolah menjadi sayur. Biji melinjo merupakan bagian terpenting karena menyimpan kandungan bioaktif, buahnya tidak lain dari biji yang terbungkus oleh kulit dalam yang kaku

atau kulit biji dan kulit luar yang tipis dapat dikonsumsi. Siswoyo (2006) biji melinjo dapat dikonsumsi setelah dimasak dan dibuang kulitnya, selain itu biji melinjo dapat digunakan sebagai bahan campuran pembuatan roti, biskuit maupun keripik emping yang dikeringkan di bawah sinar matahari dan digoreng sebelum dikonsumsi.

Biji melinjo yang masih muda memiliki kulit berwarna hijau dan semakin tua akan semakin kuning dan berubah menjadi kemerah-merahan dan lunak. Biji melinjo dilapisi oleh tiga lapisan kulit yakni kulit lunak untuk lapisan pertama, kemudian kulit keras yang berwarna coklat, dan ketiga kulit tipis dengan warna putih kotor, dan didalamnya terdapat biji yang berwarna putih kekuningan. Tanaman melinjo merupakan tanaman dengan biji terbuka (*gymnospermae*) dan tidak terbungkus oleh daging namun memiliki cangkang sebagai lapisan pembungkus daging biji. Lapisan luar biji melinjo dilapisi dengan kulit biji yang berlendir. Melinjo yang sering ditemukan di wilayah Indonesia adalah melinjo dengan jenis bercangkang keras, sedangkan melinjo dengan cangkang yang lunak dapat ditemukan di wilayah Maluku (Christiani, 2011).

Tanaman melinjo tergolong tanaman *gymnospermae* sehingga setelah terjadinya proses polinasi strobilus akan berubah menjadi zigot kemudian embrio dan menjadi biji, sedangkan pada tanaman *angyospermae* digolongkan menjadi dua jenis yakni dikotil dan monokotil, sehingga setelah proses polinasi masih terdapat perubahan bentuk dari zigot menjadi embrio kemudian juga menjadi endosperm dan ketika inti polar dan inti jantan bertemu akan menghasilkan kotiledon, sehingga pada tanaman *angyospermae* terjadi pembuahan ganda. Proses pembentukan biji diawali dengan adanya polinasi antara strobilus jantan dan betina, strobilus jantan yang memiliki stamen atau benang sari bertemu dengan putik yang kemudian saling terserbuki. Beberapa menit dari penyerbukan tersebut salah satu atau beberapa tepung sari membentuk tabung yang memungkinkan pengangkutan sperma, enzim dan sebagainya dari tepung sari ke dalam kantong embrio. Sel telur dan sperma yang melebur akan membentuk embrio dan biji. (Darmawan dan Baharsjah, 2010). Tanaman melinjo tidak memiliki bunga maupun buah yang sejati melainkan bakal biji dan biji yang

terbungkus oleh kulit luar (eksokarp). Morfologi bunga melinjo ditunjukkan pada Gambar 2.2



Gambar 2.2 Strobilus Jantan (a); Strobilus Betina (b)

Komposisi kandungan biji melinjo terdiri dari pati 58 %, lemak 16,4 %, protein (9-10) %, dan fenolik 1 %. Kandungan protein yang tinggi pada biji berguna sebagai sumber protein fungsional alami yang mempunyai potensi sebagai antioksidan dan dapat digunakan untuk bahan suplemen komersial (*nutraceutical*) (Siswoyo dan Sugiharto, 2012). Dapat berupa produk suplemen yang dapat diaplikasikan pada bahan pangan atau olahan. Biji melinjo memiliki potensi sebagai antioksidan alami. Ekstrak biji melinjo menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas, inhibitor lipase,  $\alpha$ -amilase, dan antimikroba. Siswoyo (2007) terdapat dua fraksi pada biji melinjo yang berpotensi sebagai antioksidan yaitu dengan berat molekul 12 kDa dan 30 kDa. Keduanya menunjukkan kemampuan antioksidan setara dengan *butylated hydroxytoluen* (BHT).

## 2.2 Protein Antioksidan

Protein adalah salah satu produk esensial yang diperlukan makhluk hidup dan mudah diserap oleh tubuh dalam bentuk peptida dan asam amino. Beberapa peptida memiliki aktivitas fungsional dan fisiologi seperti pencegah pendarahan (antitrombotik), antioksidan, antibakteri, antifungi, sensori dan meningkatkan nilai nutrisi makanan (Iwaniak and Minkiewicz, 2007). Protein tersusun dari berbagai asam amino yang membentuk rantai linear dan mengandung molekul karbon, nitrogen, oksigen, dan hidrogen (Marks *et al.*, 2000).

Fungsi protein dalam kehidupan terutama tumbuhan yakni untuk mengkatalis proses kerja enzim. Protein ditemukan pada daun muda dan pada bagian lainnya seperti polong dan buah. Sudikno (1991) tumbuhan menyerap unsur hara yang diperlukan dari dalam tanah melalui akar dan disalurkan keseluruh bagian tanaman sampai daun sehingga tumbuhan membentuk protein melalui proses perombakan anabolisme dan katabolisme. Protein dapat ditemukan pada seluruh organisme hidup dimulai dari bakteri, virus, hingga vertebrata dan mamalia seperti manusia. Protein yang berpotensi sebagai antioksidan dapat menghambat radikal bebas melalui beberapa mekanisme. Mekanisme kerja protein sebagai antioksidan tergantung pada komposisi asam amino yang terkandung di dalamnya.

Antioksidan adalah senyawa dalam konsentrasi rendah dapat menstabilkan radikal bebas dengan cara mendonorkan elektron dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas baru tanpa merubah fungsinya (Simanjuntak, 2007). Keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stres oksidatif (Chapple, 2007). Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan dikelompokkan menjadi tiga kelompok yakni antioksidan primer atau yang berasal dari dalam tubuh (endogen) atau antioksidan enzimatis, antioksidan sekunder atau yang berasal dari luar tubuh (eksogen) antioksidan non enzimatis, dan antioksidan tersier. Antioksidan primer adalah antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh yang terdiri dari antioksidan enzimatis seperti superoksida dismutase (SOD), *glutathione peroxydase* (G-SH Px).

Antioksidan dapat dikatakan primer (enzimatis) apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Sedangkan antioksidan sekunder (non enzimatis) adalah antioksidan yang berasal dari luar tubuh seperti senyawa flavonoid, vitamin C, vitamin E, dan karotenoid. Kelompok antioksidan tersier meliputi system enzim DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam proses perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (Winarsi, 2005). Antioksidan yang berasal dari dalam tubuh tidak cukup untuk melawan radikal bebas. Oleh karena itu perlu

adanya tambahan antioksidan dari luar tubuh untuk mengurangi kapasitas radikal bebas yang dapat menimbulkan kerusakan sel. Soltani and Baharara, (2014) Radikal bebas dapat menginduksi penyakit kanker, penyakit jantung degeneratif, stroke, dan penyakit arteri (arteriosklerosis), dan penuaan dini yang disebabkan oleh rusaknya jaringan karena proses oksidasi, maka dari itu diperlukan antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas.

Kemampuan protein untuk berinteraksi dengan radikal bebas telah banyak diteliti. Dua puluh asam amino yang ditemukan dalam protein yang memiliki potensi untuk berinteraksi dengan radikal bebas. Protein memiliki potensi sebagai antioksidan karena dapat menonaktifkan *reactive oxygen species* (ROS), peredaman radikal bebas, pengikatan logam transisi pro oksidatif (menjauhkan logam dari lipid yang rentan teroksidasi dan hidrogen peroksida, mengurangi reaktivitas kimia dari logam transisi), serta reduksi hidrogen peroksida (Elias *et al.*, 2008; Ostdal *et al.*, 2002). Antioksidan memiliki kemampuan dalam meredam radikal bebas dan juga terdapat tiga mekanisme peredaman yang dapat dilakukan oleh antioksidan, diantaranya ialah mencegah pembentukan radikal bebas baru, menonaktifkan radikal yang telah terbentuk atau pemutusan rantai reaksi dan akan memperbaiki kerusakan yang diakibatkan oleh radikal (Winarsi, 2005).

Radikal bebas dapat merusak susunan protein yang ada didalam tubuh manusia juga menimbulkan berbagai penyakit. Senyawa radikal bebas dapat dikurangi dengan memanfaatkan peran senyawa antioksidan seperti vitamin C, E, A, karoten, asam-asam fenol, polifenol dan flavonoid, dan terbukti beberapa tanaman memiliki senyawa fenolik dan flavonoid (Suriyanto, 2012). Radikal bebas berbahaya bagi tubuh manusia karena dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel dapat menyebabkan kanker dan mempengaruhi produksi protein seperti enzim yang terdapat dalam tubuh. Radikal bebas mengambil elektron dari DNA sehingga mempengaruhi perubahan struktur DNA dan menyebabkan sel-sel bermutasi. Sel yang mengalami mutasi secara perlahan akan menyebabkan kanker. Radikal bebas juga berperan dalam proses penuaan, reaksi inisiasi radikal bebas di mitokondria menyebabkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang bersifat reaktif seperti superoksida dan hidroksil.

Radikal bebas dapat dihasilkan dari asap rokok, penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan serta polutan lainnya (Dorge, 2002).

Radikal bebas adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang menjadikan radikal bebas sangat reaktif terhadap senyawa atau molekul lain (Halliwell, 2005). Radikal bebas akan mengambil elektron dari senyawa atau molekul lain untuk mencapai kestabilan kimiawi, sedangkan senyawa atau molekul yang sudah kehilangan elektronnya akan menjadi rusak dan menjadi spesies radikal baru. Peristiwa pembentukan radikal baru secara berkelanjutan ini dinamakan reaksi berantai yang pada akhirnya akan merusak struktur makromolekuler seperti protein, lemak, bahkan DNA sel yang dapat menimbulkan terjadinya penyakit degeneratif (Leong and Shui, 2001; Arief, 2006). Penyebab terjadinya radikal bebas dapat berasal dari luar tubuh (eksogen) maupun dalam tubuh (endogen). Radikal bebas yang berasal dari luar tubuh seperti obat-obatan, radiasi sinar X, sinar gamma, asap rokok, ozon, dan lain sebagainya (Mehta, 2009). Sedangkan yang berasal dari dalam tubuh yakni reaksi redok dan autooksidasi, oksidasi enzimatis, dan organel subseuler. Produksi radikal bebas endogen akan meningkat pada saat metabolisme enzim dan zat kimia terjadi inflamasi dimana radikal bebas dihasilkan oleh leukosit (Kumar *et al.*, 2015).

Salah satu jenis radikal bebas adalah *reactive oxygen species* (ROS) atau spesies oksigen reaktif. ROS adalah jenis radikal bebas yang berasal dari oksigen (Kumar *et al.*, 2015). ROS terdiri dari beberapa senyawa non radikal seperti hidrogen peroksida, oksigen tunggal, dan asam hipoklorit. Produksi ROS dalam jumlah kecil di dalam tubuh terjadi pada reaksi fisiologi tubuh. ROS diproduksi dalam keadaan normal dan telah diatur ketat oleh tubuh untuk menghindari terjadinya radikal bebas yang merugikan. Akan tetapi produksi ROS secara berlebihan akan mengakibatkan kerusakan komponen seluler seperti protein, lemak, dan DNA. Kerusakan yang ditimbulkan oleh ROS dapat melalui tiga reaksi berupa peroksidasi lemak membrane, reaksi silang, dan perubahan lain pada protein serta kerusakan DNA (Kumar *et al.*, 2015).

Pembentukan radikal bebas dikendalikan secara alami oleh berbagai senyawa bermanfaat yang dikenal sebagai antioksidan. Apabila ketersediaan

antioksidan terbatas, maka kerusakan dapat menjadi akumulatif yang dapat melemahkan fungsi sel tubuh. Pada serangan awal, radikal bebas dapat dinetralisir, akan tetapi adanya radikal bebas lain yang terbentuk dapat menyebabkan terjadinya reaksi berantai (Percival, 1998). Antioksidan diharapkan mampu mencegah terjadinya berbagai penyakit akibat radikal bebas. Salah satu potensi sumber antioksidan alami yang sudah banyak diteliti adalah biji melinjo. Kandungan antioksidan yang tinggi dari ekstrak biji melinjo menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas, antimikroba, inhibitor lipase dan  $\alpha$ -amilase. Selain itu juga diketahui bahwa ekstrak biji melinjo mampu menurunkan kadar glukosa dalam tubuh, membuang sel yang sudah tidak diperlukan oleh tubuh (apoptosis) sel kanker, serta memiliki aktivitas penghilang radang (antiinflamasi) dan antibakteri (Kato *et al.*, 2009).

### **2.3 Hipotesis**

Hipotesis pada penelitian ini adalah perubahan fase generatif melinjo berpengaruh terhadap kandungan bioaktif protein beserta aktivitas antioksidan.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2016 – Maret 2017 di Laboratorium Analisis Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel melinjo berdasarkan fase generatif biji yakni bunga (strobilus) jantan dan betina, biji muda, biji berwarna hijau, hijau kekuningan, kuning kehijauan, kuning, kuning kemerahan, dan merah.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , *bovine serum albumin* (BSA), *glutathione* (G-SH), *comassie brilliant blue* (CBB G-250), *comassie brilliant blue* (CBB R-250), etanol, *2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid* (ABTS), potasium persulfat, amonium persulfat, NaCl, HCl, tris-HCl pH 6,8 dan pH 8,8, akrilamid, *sodium dodecyl sulphate* (SDS), TEMED, glycerol, bromophenol blue, mercaptoetanol, glisin, tris base, metanol, asam asetat, dan marker protein sigma M 4038.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar stumpler, eppendorf, sentrifuge (sartorius), tabung reaksi, mikropipet, vortex (medline), spektrofotometer (shimadzu UV 1800), gelas ukur, beaker glass, serta seperangkat alat elektroforesis dan alat pendukung lainnya.

#### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

Metode yang dilakukan yakni dengan memberikan perlakuan pada setiap fase pembentukan biji melinjo yang diambil dengan ketentuan diameter dan panjang biji, parameter ini digunakan pada fase generatif biji, penjabarannya adalah sebagai berikut :

1. Bunga (strobilus) jantan dan betina
2. Biji muda
3. Biji berwarna hijau
4. Hijau kekuningan
5. Kuning kehijauan

6. Kuning
7. Kuning kemerahan
8. Merah.

### 3.3.1 Ekstraksi Protein

Sampel biji dan bunga digerus yang dilarutkan menggunakan bufer fosfat pH 7,4 dengan perbandingan 1:3 antara sampel dan buffer, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, untuk diambil supernatannya.

### 3.3.2 Pengukuran Total Protein Perlarut

Kadar protein ditentukan dengan metode Bradford (1976) supernatan 5  $\mu\text{L}$  dicampur dengan 45  $\mu\text{L}$  aquadest dan larutan bradford 950  $\mu\text{L}$ . Selanjutnya larutan divortex hingga homogen. Absorban diukur pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 595 nm. Larutan standar protein yang digunakan adalah larutan *bovine serum albumin* (BSA) dengan konsentrasi 0, 2, 5, 10, 15, dan 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  yang dicampur aquadest dengan volume 50, 48, 45, 40, 35, 30  $\mu\text{l}$  dan larutan pereaksi bradford 950  $\mu\text{L}$ , kemudian divortex agar larutan menjadi homogen. Penentuan total protein terlarut bertujuan untuk mengetahui kandungan protein terlarut pada sampel melinjo berdasarkan fase generatif.

### 3.3.3 Penentuan Pola Pita Protein

Menyiapkan *separating gel* 15 %. Kemudian memasukkan ke dalam plate elektroforesis hingga mencapai batas, tambahkan aquades agar permukaan gel rata dan untuk menghindari adanya gelembung pada gel, kemudian gel diinkubasi selama 30 menit hingga terbentuk gel (polimerasi). Setelah itu masukkan *stacking gel* ke dalam plate hingga penuh kemudian masukkan sisir (comb) secara perlahan, kemudian inkubasi sampai terbentuk gel (polimerasi). Setelah polimerasi, cabut sisir dari plate secara perlahan, kemudian pindahkan plate ke dalam tank elektroforesis. Selanjutnya menyiapkan sampel loading dengan perbandingan 1:1. Kemudian didenaturasikan pada suhu 100°C selama 5 menit.

Merakit perangkat alat elektroforesis. Mengisi reservoir atas dan bawah dengan buffer elektroda (buffer running). Kemudian memasukkan sampel ke dalam sumuran sesuai dengan konsentrasi protein terlarut yang sudah ditentukan. Selanjutnya menghubungkan alat dengan power supply dan running gel pada tegangan 50 volt pada tahap pertama selama 45 menit kemudian 80 volt selama 180 menit atau hingga sampel telah mencapai bagian dasar plate. Setelah proses elektroforesis selesai, tahap selanjutnya yakni melepas perangkat alat elektroforesis dan gel. Melakukan pewarnaan gel (staining dye). Proses pewarnaan dilakukan selama 24 jam (over night). Selanjutnya melakukan proses pencucian (*destaining*). Kemudian untuk tahap terakhir yakni mencuci gel dengan menggunakan aquadest kemudian dokumentasi untuk diamati berat molekul.

#### 3.3.4 Pengukuran Aktivitas Antioksidan

Uji peredaman radikal ABTS sesuai dengan metode yang dideskripsikan oleh You *et al.* (2011) reagen 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) dipersiapkan dengan mencampurkan 7 mM ABTS 0,38 g dan 2,45 mM potasium persulfate 0,066 g yang kemudian diinkubasi 12 jam ditempat gelap pada suhu ruang. Sebelum memulai pengujian, reagen ABTS dilarutkan dengan 5mM *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4 hingga mencapai nilai absorbansi  $\pm 0,70$  pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 734 nm. Sedangkan untuk pengujian menggunakan sampel, yakni dengan cara menyamakan konsentrasi sampel protein sebanyak 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Uji peredaman ABTS dinyatakan sebagai persen (%) penghambatan terhadap radikal ABTS. Persen penghitungan dihitung sesuai rumus:

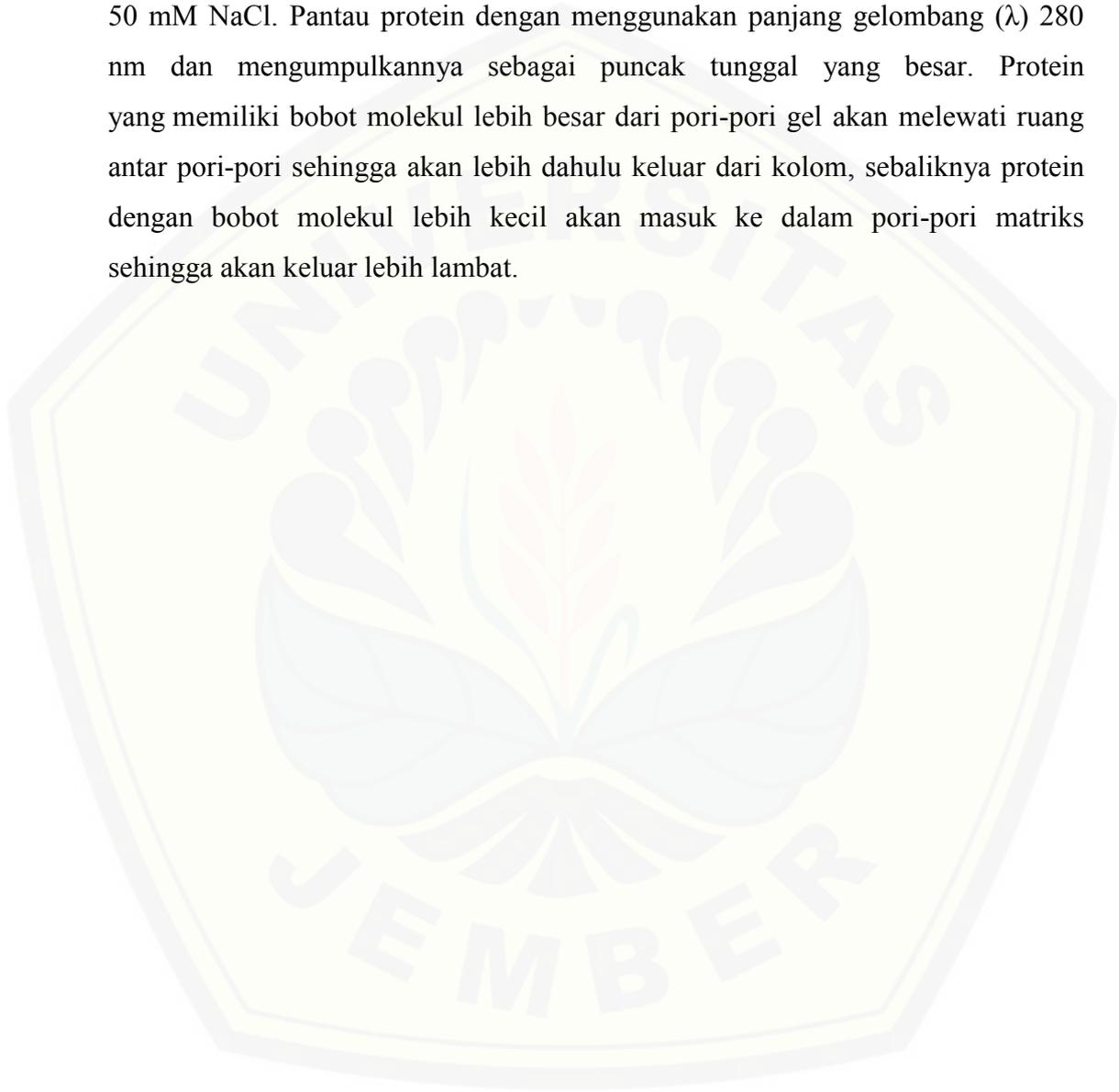
$$\text{Peredaman ABTS (\%)} = [(A_c - A_s) / A_c] \times 100\%$$

Dimana ( $A_c$ ) merupakan nilai absorbansi tanpa penambahan sampel (blanko) dan ( $A_s$ ) adalah nilai absorbansi dengan penambahan sampel.

#### 3.3.5 Fraksinasi Protein Antioksidan

Fraksinasi protein biji melinjo fase hijau dimurnikan menggunakan *fast protein liquid chromatography* (FPLC). Prinsip dari gel filtrasi adalah pemisahan

molekul berdasarkan perbedaannya. Proses pemurnian dengan kolom filtrasi menggunakan gel sephadex G-25. Menentukan gel filtrasi (resin sephadex G-25) sebelum memasukkan pada kolom kaca. Sampel protein diinjeksikan sebanyak 300  $\mu$ l pada bagian atas kolom dalam 50 mM bufer Na-Fosfat pH 7 dan 50 mM NaCl. Pantau protein dengan menggunakan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 280 nm dan mengumpulkannya sebagai puncak tunggal yang besar. Protein yang memiliki bobot molekul lebih besar dari pori-pori gel akan melewati ruang antar pori-pori sehingga akan lebih dahulu keluar dari kolom, sebaliknya protein dengan bobot molekul lebih kecil akan masuk ke dalam pori-pori matriks sehingga akan keluar lebih lambat.



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

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

1. Fase generatif melinjo (*Gnetum gnemon* L.) yang memiliki kandungan bioaktif protein tinggi sebesar 6,32 mg/g pada fase hijau.
2. Persentase peredaman aktivitas antioksidan tinggi pada fase generatif dengan persen aktivitas peredaman sebesar 66,5 % pada fase hijau.
3. Hasil fraksinasi protein biji melinjo pada fase hijau memiliki potensi sebagai aktivitas antioksidan berdasarkan hasil analisa ABTS dengan nilai persen aktivitas peredaman sebesar 44,0 % pada fraksi keempat.
4. Waktu yang efektif untuk menghasilkan bioaktif protein yang mempunyai aktivitas antioksidan yakni pada saat biji berwarna bijau atau masak muda.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diberikan saran sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jenis protein spesifik yang memiliki aktivitas antioksidan, serta efek samping protein biji melinjo, misalnya uji alergi atau uji toksisitas
2. Lebih teliti dalam penggunaan alat seperti mikropipet, spektrofometer pada setiap pengukuran kandungan protein terlarut maupun aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., Johnsons, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. 2002. *Molecular Biology of The Cell*. Edisi 4. New York: Garland Science.
- Arief, S. 2006. *Radikal Bebas*. Surabaya: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK Unair/RS. Dr. Soetomo.
- Birbren, E., Sahiner, U. M., Sackseen, C., Erzurum, S., and Kalayci, O. 2012. Oxydative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization*, 5(1): 9.
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Cadiz, R. T., and Florido, H. B. 2001. Bago: *Gnetum gnemon* Linn. *Research Information Series on Ecosystem*, 13(2).
- Chapple, I. L. C., and Matthews, J. B., 2007. The Role of Reactive Oxygen and Antioxidant Species in Periodontal Tissue Destruction. *Complatin. Periodontology*, 43: 160-232.
- Christiani, C. A. 2011. *Perbanyakan Tanaman Melinjo (Gnetum gnemon) dengan Teknik Cangkok di Kebun Benih Hortikultura Tejomantri Wonorejo Polokarto Sukoharjo*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Darmawan, J. dan J. S. Baharsjah. 2010. *Dasar-Dasar Fisiologi Tanaman*. Jakarta: SITC.
- Dorge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological control of Cell Function. *Physiol*, 82(1): 47-95.
- Dunn, M. J. 1989. *Determination of Total Protein Concentration and Protein Purification Methods*. England: IRI Pers Oxford.
- Dwidjoseputro, D. 1986. *Pengantar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: Gramedia.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., and Decker, E. A. 2008. Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48: 430-441.
- Fitriana, W. D., Sri, F., dan Taslim, E. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-fraksi Daun Kelor (*Moringa oliefera*).

*Prosiding Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains*. Bandung, Indonesia.

Guyton, A. C., Hall, J. E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Edisi ke 11. Philadelphia: Elsevier Inc.

Halliwell, B. 2005. *Free Radicals and other Reactive Species in Disease*. eLS.

Harborne, J. B. 1984. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB.

Hartoyo, A. 2003. *Teh dan Khasiatnya Bagi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.

Iwaniak, A., and Minkiewicz, 2007. Protein as the Sources of Physiologically and Fuctionally Actives Peptides. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 6: 5-15.

Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., and Kim, S.K. 2007. Purification and Characterization of an Antioxidant Peptide Obtained from Tuna Backbone Protein by Enzymatic Hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42: 840-846.

Kato, E., Y. Tokunaga and F. Sakan. 2009. Stilbenoids Isolated From Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) and Their Biological Activity. *Agricultural and Food Chemistry*, 57(1): 2544-2549.

Kawai, T. and Itoh, Y. 1990. Clinical application of Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System. *Rinsho Byori*, 38(1): 57-60.

Kikuzaki, H., and N. Nakatami. 1993. Antioxidant Effecfs of Some Ginger Constituen. *Food Sci*, 58(6): 1407-1410.

Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., Shahidi, F. 2001. Isolation and Characterization of Antioxidative Peptides From Gelatin Hydrolysate of Alaska Pollack Skin. *Agric. Food Chem*, 49: 1984-1989.

Konno, H., Y. Kanai, M. Katagiri, T. Watanabe, A. Mori, T. Ikuta, H. Tani, S. Fukushima, T. Tatefuji and T. Shirasawa. 2013. *Melinjo (Gnetum gnemon L.) Seed Extract Decreases Serum Uric Acid Levels in Nonobese Japanese Males : a Randomized Controlled Study*. Japan: Hindawi Publishing Corporation.

Kumar, V., Abbas, A. K., and Aster, J. C. 2015. *Buku Ajar Patologi Robbins*. Edisi 9. Diterjemahkan oleh Nasar, I. M., Cornain, S. Elsevier.

Langseth, L. 1995, *Oxidants, Antioxidants and Disease Prevention*. Belgium: ILSI Europe.

- Leong, L. P., and Shui, G. 2002. an Investigation of Antioxidant Capacity of Fruits in Singapore Markets. *Food Chemistry*, 76: 69-75.
- Lim, T. K. 2012. Edible Medicinal and Non-medicinal Plants. *Science and Bussiness Media*, 3: 45-50.
- Makkar, H. P. S., Shiddurajju, P., and Becker, K. 2007. *Plant Secondary Metabolites*. New Jersey: Humana Press.
- Marks, D. B., Marks, A. D., and Collen, M. S. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: Sebuah Pendekatan Klinis*. Jakarta: EGC.
- Mehta, A., Tuli, R., Chintamaneni, M., and Kuar, G. 2009. Antioxidants: the Need of Hour. *Pharmacology*, 206: 650-677.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., and Van Beek, T. 2004. Screening of Radical Scavenging Activity of Some Medicinal and Aromatic Plant Extracts. *Food Chemistry*, 231-237.
- Mulyanto, J. 1995. *Budidaya Melinjo*. Yogyakarta: Kanisius.
- Mulyanto, J. 2003. *Pembibitan dan Budidaya Melinjo*. Yogyakarta: Kanisius.
- O'Fagain, C., Philip, M. C., and Brendan, F. O. 2011. Gel Filtration Chromatography. *Molecular Biology*, 681: 25-33.
- Ostdal, H., Davies, M. J., and Andersen, H. J. 2002. Reaction Between Protein Radicals and their Biomolecules. *Free Rad Biol Med*, 33: 201-209.
- Percival, M. 1998. Antioxidants Clinical Nutrition Insight. *NUT031*: 1(96).
- Rahardja, P. C. 2002. *Bertanam Melinjo*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Rohmatussolihat. 2009. Antioksidan, Penyelamat Sel-sel Tubuh Manusia. *BioTrends*, 4(1).
- Salisbury, F. B. dan C. W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3 Terjemahan Oleh Dr. Diah, R., Lukman, dan Ir. Sumaryono (1995). Bandung: ITB.
- Simanjuntak, K. 2007. Radikal Bebas dari Senyawa Toksik Karbon Tetraklorida (CCL4). *Bina Widya*, 18: 25-31.

- Siswoyo, T. A. 2006. Pengaruh Sodium Chloride Terhadap Sifat Termal Protein 30 kDa yang Diisolasi dari Biji Melinjo. *Teknol. Industri dan Pangan*, 17(3): 214-220.
- Siswoyo, T. A., dan Bambang, S. 2012. Produksi Pengembangan Protein Antihipertensi Generasi Baru dari *Gnetum gnemon* Preprotein sebagai Bahan *Nutraceutical* Komersial, *Prosiding InSINas*, 217-222.
- Siswoyo, T. A., Eka, M., Kyun, O. L., and Keizo, H. 2011. Isolation and Characterization of Antioxidant Protein Fractions from Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Seeds. *Agric. Food Chem*, 59: 5648-5656.
- Siswoyo, T. A., Purnama, O., and Bambang, S., 2007. Isolation and Characterization of Free Radical Scavenging Activities Peptides from the Melinjo Seed (*Gnetum gnemon* L.). In: *Proceeding of International Conference, Science and Technology for Integration of Life*, Seoul.
- Soltani, M., and Baharara, J. 2014. Antioxidant and Antiprolifereative Capacity of Dichloromethane Extract of *Holoturia leucospilota* sea cucumber. *Cellular and Molecular Biotechnology*, 1-9.
- Sudikno, T. S. 1991. Some Effort to Accelerate the Germination of *Gnetum* Seed (*Gnetum gnemon* L.). *Agricultural Science*, 4(6): 257-272.
- Sunarto, H. 1991. *Budidaya Melinjo dan Usaha Produksi Emping*. Yogyakarta: Kanisius.
- Suriyanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Surabaya: Putra Media Nusantara.
- Tampubolon, W. 2013. *Informasi Singkat Benih*. Direktorat Pembenihan Tanaman Hutan. Makassar: BPTH Sulawesi.
- Uchino, K. Y., and Tatsuda, S. 1994. Relation of Harvest Date and Skin Color to Fruit Quality of Loquat 'Mogi' During Maturation. *Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 63: 479-484.
- Wang, Wen-Bin, Yun-Hee, K., Haeng-Soon, L., Ki-Yong, K., Xi-Ping, D., and Sang-So, K. 2009. Analysis of Antioxidant Enzyme Activity during Germination of Alfafa under Salt and Drought Stress. *Plant Physiology and Biochem*, 47: 550-577.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.

You, L., M, Zhao., J. M. Regentesin., and J, Ren. 2010. Changes in the Activity of Loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) Protein Hydrolysates During a Simulated Gastrointestinal Digestion. *Food Chemistry*, 120: 810-816.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Sampel Ekstraksi Protein Antioksidan

1.1 Sampel Melinjo Fase Generatif



Keterangan : Bunga jantan (J); bunga betina (B); biji muda (BM); biji berwarna hijau (H); hijau kekuningan (HK); kuning kehijauan (KH); kuning (K); kuning kemerahan (KM), dan merah (M).

1.2 Konsentrasi Ekstrak Sampel untuk Analisis Protein Antioksidan

Maserasi = berat : volume buffer fosfat pH 7,4 (1:3)

Sampel	Berat (g)	Volume Buffer fosfat pH 7,4 (mL)	Volume Supernatan (mL)
Bunga jantan	3,07	9,21	6,4
Bunga betina	2,50	7,50	5,8
Biji muda	2,72*	8,16	6,4
Biji hijau	2,82*	8,46	7,4
Hijau kekuningan	3,36*	10,08	8,2
Kuning kehijauan	3,92*	11,76	8,4
Kuning	3,35*	10,05	7,8
Kuning kemerahan	3,40*	10,20	6,4
Merah	3,57*	10,71	8,2

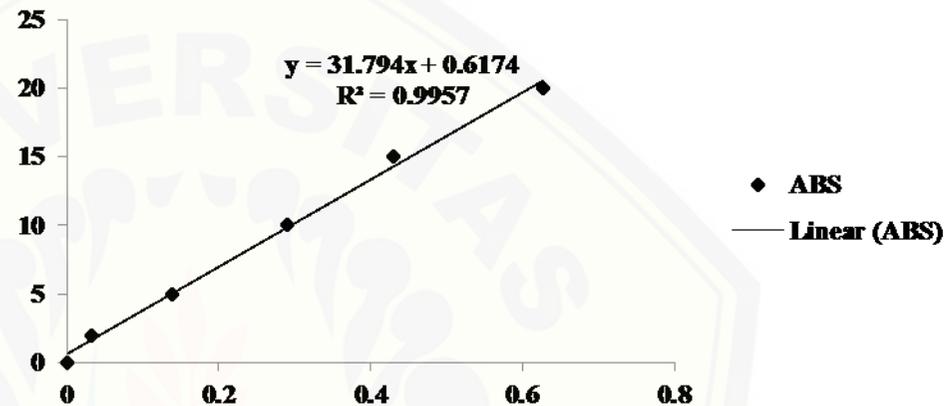
Keterangan : \*Nilai diperoleh dari rerata (n = 3 biji).

Lampiran 2. Perhitungan Kandungan Protein Biji Melinjo

2.1 Standar BSA untuk penentuan Total Protein Terlarut

Konsentrasi BSA (µg/µL)	Absorbansi
0	0
2	0.032
5	0.139
10	0.290
15	0.431
20	0.627

Kurva Standar BSA



2.2 Hasil Pengukuran Total Protein Terlarut

Sampel	Absorbansi			Konsentrasi Protein µg/µL			Rerata	Volume (mL)	Jumlah Protein (mg/g)	Stedev
	1	2	3	1	2	3				
J	0.283	0.288	0.303	1.676	1.708	1.803	1.729	6.4	3.604	0.138
B	0.401	0.377	0.398	2.426	2.274	2.407	2.369	5.8	5.496	0.193
BM	0.190	0.230	0.200	1.085	1.339	1.148	1.191	6.4	2.801	0.311
H	0.521	0.352	0.322	3.189	2.115	1.924	2.409	7.4	6.322	1.790
HK	0.415	0.362	0.304	2.515	2.178	1.809	2.168	8.2	5.290	0.861
KH	0.382	0.373	0.339	2.305	2.248	2.032	2.195	8.4	4.704	0.309
K	0.324	0.304	0.294	1.937	1.809	1.746	1.831	7.8	4.262	0.226
KM	0.329	0.455	0.282	1.968	2.769	1.670	2.136	6.4	4.020	1.071
M	0.416	0.403	0.320	2.522	2.439	1.911	2.291	8.2	5.261	0.761

**Lampiran 3. Aktivitas Peredaman ABTS Protein Biji Melinjo**

3.1 Perhitungan Aktivitas Peredaman ABTS Protein Biji Melinjo

Sampel	Absorbansi			Blanko	Rerata Peredaman (%)	Stdev
	1	2	3			
J	0.516	0.490	0.471	0.648	24.0	0.035
B	0.567	0.551	0.552	0.648	14.1	0.014
BM	0.558	0.546	0.530	0.648	15.9	0.022
H	0.258	0.209	0.185	0.648	66.5	0.057
HK	0.437	0.384	0.390	0.648	37.7	0.045
KH	0.383	0.412	0.378	0.648	39.7	0.028
K	0.327	0.361	0.338	0.648	47.2	0.027
KM	0.437	0.371	0.401	0.648	37.8	0.051
M	0.434	0.452	0.392	0.648	34.3	0.048
BSA	0.927	0.899	0.915	0.953	4.1	0.015
GSH	0.116	0.111	0.120	0.786	85.3	0.006

3.2 Perhitungan Aktivitas Peredaman ABTS Fraksi Biji Melinjo Fase Hijau

Fraksi	Absorbansi			Blanko	Rerata Peredaman (%)	Stdev
	1	2	3			
F1	0.543	0.533	0.437	0.595	15.2	0.098
F2	0.516	0.512	0.425	0.595	18.6	0.086
F3	0.469	0.483	0.434	0.595	22.4	0.042
F4	0.366	0.362	0.272	0.595	44.0	0.089
F5	0.402	0.395	0.357	0.595	35.4	0.041
F6	0.411	0.385	0.374	0.595	34.5	0.032
F7	0.472	0.468	0.417	0.595	24.0	0.052
F8	0.471	0.474	0.425	0.595	23.2	0.046
F9	0.462	0.456	0.404	0.595	25.9	0.054
F10	0.475	0.459	0.419	0.595	24.2	0.048
BSA	0.927	0.899	0.953	0.953	4.1	0.015
GSH	0.116	0.111	0.120	0.786	85.3	0.006

**Lampiran 4. Komposisi Bahan yang Digunakan dalam Penelitian**

4.1 Komposisi buffer fosfat pH 7,4

0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,3 mL
0,2 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	94,7 mL
Aquadest	sampai 200 mL

4.2 Komposisi pereaksi Bradford

CBB G-250	100 mg
Etanol 95%	50 mL
Asam Fosfat 85%	100 mL
Aquadest	sampai 1000 mL

4.3 Komposisi SDS-PAGE

*Separating gel 15%*

Akrilamida (30% T, 2,7% C)	3340 µL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1660 µL
TEMED	3,4 µL
10% APS	33,4 µL
H <sub>2</sub> O	1600 µL

*Stacking gel*

Akrilamida (30% T, 2,7% C)	500 µL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	740 µL
TEMED	3µL
10% APS	14,8 µL
H <sub>2</sub> O	1700 µL

*Stok sampel buffer*

0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,2 mL
Gliserol	1 mL
10% SDS	2 mL
0,5% Bromofenol Blue	0,5 mL
Aquadest	4,8 mL

*SDS-reducing buffer*

2-merkaptotanol	50 $\mu$ L
Stok sampel buffer	950 $\mu$ L

*Running buffer*

0,025 M Tris base	3 g
0,192 M Glisin	14 g
0,1% (w/v) SDS	1 g
Aquadest sampai	1000 mL

*Larutan staining*

CBB R-250	0,2 g
Metanol	80 mL
Asam asetat	20 mL
Aquadest	sampai 1000 mL

*Larutan destaining*

Metanol	80 mL
Asam asetat	20 mL
Aquadest	sampai 200 mL

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian



*Magnetic Stirrer (Medline)*



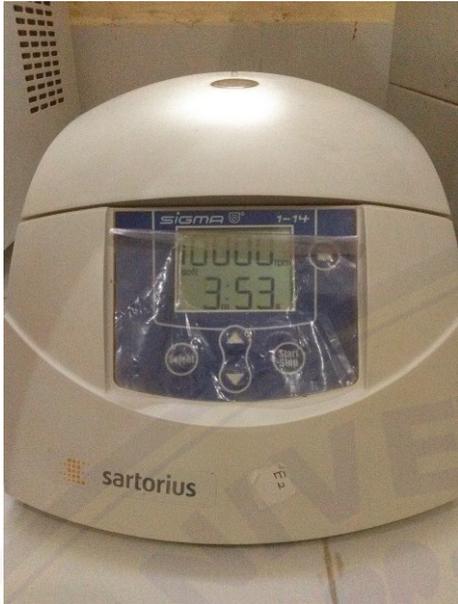
*pH Meter (Martini)*



*Timbangan Analitik (Sartorius)*



*Shaker (Medline)*



*Sentrifuge (Sartorius)*



*Vortex (Medline)*



*Spektrofotometer (Shimadzu UV 1800)*



*Inkubator (Selecta)*