

3. INTERAKSI SENYAWA ANTIOKSIDAN TEH DENGAN SUSU

Pada minuman kombinasi teh dengan tambahan susu atau *milk tea*, peneliti terdahulu menemukan perubahan nilai aktivitas antioksidan pada senyawa polifenol yang disebabkan penambahan susu ke dalam teh yang menunjukkan hasil yang kontradiktif (Dubeau & Samson, 2010). Hasil tersebut dilengkapi dengan hipotesis dari salah satu penelitian yang mengatakan bahwa volume susu dan variasi dari kandungan lemak pada susu yang ditambahkan ke dalam teh dapat mempengaruhi kapasitas antioksidan teh (Ryan & Petit, 2010). Perbedaan hasil dari aktivitas antioksidan terjadi berdasarkan empat faktor yaitu pengaruh bahan uji polifenol teh, bahan uji jenis susu, dan perbandingan komposisi dari teh dan susu terhadap aktivitas antioksidan serta pengaruh dari perbedaan metode pengujian yang digunakan masing-masing peneliti. Hal utama yang harus dilakukan untuk mendapatkan hasil aktivitas antioksidan dari interaksi polifenol teh dengan protein susu adalah mengidentifikasi karakteristik struktural interaksi tersebut. Perbedaan hasil aktivitas antioksidan dari interaksi beberapa jenis komponen dari protein susu (α -casein, β -casein, dan β -laktoglobulin) dengan senyawa polifenol teh hijau atau teh hitam dikumpulkan hasilnya dari beberapa jurnal yang dilampirkan di Tabel 3.

Tabel 3. Interaksi Senyawa Antioksidan Teh dengan Susu

No	Judul penelitian	Metode	Jenis Teh	Jenis Susu	Pengaruh terhadap Antioksidan	Referensi
1.	<i>Interaction of Milk α and β casein with tea polyphenols</i>	FTIR dan Fluoresensi	EGCg, EGC, EC, C	α - dan β -kasein	Urutan ikatan polifenol semakin meningkat seiring dengan bertambahnya jumlah gugus OH, C~EC > EGC > EGCg. β -kasein membentuk kompleks yang lebih kuat dengan teh polifenol dibandingkan α -kasein karena bersifat lebih hidrofobik.	Hasni <i>et al.</i> , 2011
2.	<i>Competitive interaction among tea catechins, proteins,</i>	FRAP dan ABTS	EGCg, EGC, dan EC	Protein Susu (β -Lg or β -CN)	Hasil interaksi polifenol teh dengan protein susu adalah kandungan katekin setelah melalui sistem pencernaan (lambung dan usus)	Qie <i>et al.</i> , 2021

					mengalami kenaikan namun jika tanpa tambahan susu kandungan katekin akan menurun	
3.	<i>A single dose of the with or without milk increases plasma antioxidant activity in human</i>	FRAP	Teh Hijau dan Hitam	Susu pasteurisasi <i>full-fat</i>	Penambahan susu pasteurisasi pada teh tidak memengaruhi efek dari peningkatan aktivitas antioksidan	Leenen <i>et al.</i> , 2000
4.	<i>Addition of Milk Does Not Alter the Antioxidant Activity of Black Tea</i>	FRAP	Teh Hitam	Susu pasteurisasi dengan konsentration 20% v/v	Penambahan susu pasteurisasi pada teh hitam tidak mempengaruhi kapasitas antioksidan pada teh hitam	Reddy <i>et al.</i> , 2005
5.	<i>Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay</i>	FRAP	Teh Hijau dan Hitam	Susu murni, Susu semi-skim, Susu skim, dan susu kedelai	Interaksi teh hitam dengan susu murni memiliki persen penurunan potensi antioksidan paling besar dibandingkan keempat jenis susu lainnya.	Leenen <i>et al.</i> , 2000
6.	<i>Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas</i>	ABTS, Voltammetry, lipid peroxidation inhibition	Teh Hijau, Teh Darjeeling, dan Teh <i>English breakfast</i> (Teh Hitam)	2% skim milk,	Hasil dari metode ABTS dan <i>Voltammetry</i> (susu menurunkan kapasitas antioksidan polifenol teh) berbeda dengan <i>lipid peroxidation</i> (susu meningkatkan kapasitas antioksidan teh dalam model oksidasi asam linoleat teremulsi).	Dubeau & Samson, 2010

8.	<i>Influence of milk and sugar on antioxidant potential of black tea</i>	DPPH	Teh hitam	Susu	Penambahan susu pada teh hitam menurunkan aktivitas antioksidan	Sharma <i>et al.</i> , 2008
9.	<i>Interactions of black and green tea polyphenols with whole milk</i>	FTIR dan Uji ORAC	Teh Hijau dan Teh Hitam	Susu <i>full cream</i> UHT 40% v/v	Karakteristik interaksi polifenol teh hitam dan hijau pada susu berbeda. Struktur katekin akan mempengaruhi <i>binding affinity</i> yang menghasilkan interaksi teh hitam dengan susu mengalami lebih banyak pengurangan pada intensitas nilai absorbansi dibandingkan teh hijau dengan susu	Ye <i>et al.</i> , 2013
10.	<i>Interactions between milk fat globules and green tea catechins</i>	FRAP dan Uji ORAC	EGC, C, EGCg, EC, ECg	Globular lemak susu 4% (w/v)	Interaksi membran globular lemak susu (<i>Milk Fat Globule Membrane</i> / MFGM) dengan katekin menurunkan aktivitas antioksidan dengan nilai absorbansi dari MFGM.	Rashidinejad <i>et al.</i> , 2016
11.	<i>Milk β-lactoglobulin complexes with tea polyphenols</i>	FTIR	C, EC, ECG, EG Cg	β -laktoglobulin	Urutan polifenol yang memiliki nilai konstanta kesetimbangan terbesar hingga terkecil dengan protein susu adalah EGCg > ECg > EC C	Kanakakis <i>et al.</i> , 2011

3.1 Pengaruh Bahan Uji Polifenol Teh terhadap Karakterisasi Struktural Interaksi

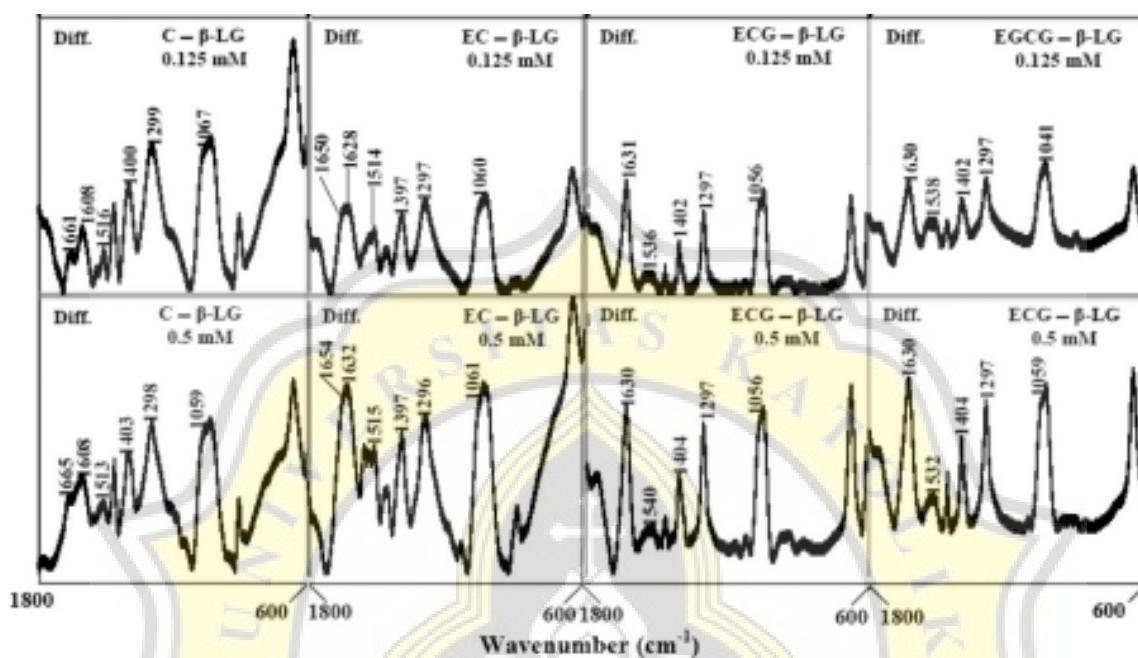
Faktor yang menentukan aktivitas antioksidan dari senyawa polifenol teh adalah jumlah dan posisi gugus hidroksil (OH) dan cincin aromatik, semakin banyak jumlah gugus OH maka ikatan afinitas semakin meningkat. Afinitas pengikatan polifenol dengan protein juga bergantung pada ukuran molekulnya. Senyawa polifenol pada teh hitam memiliki ukuran lebih besar dibandingkan dengan teh hijau, dikarenakan proses oksidasi atau polimerisasi fermentasi dari monomer katekin sehingga lebih mudah berikatan dengan protein dari susu (Dubeau & Samson, 2010). Perbedaan ukuran molekul antara teh hijau dan teh hitam menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang berbeda pada interaksi polifenol dengan protein susu. Interaksi tersebut dapat mempengaruhi kapasitas donasi

elektron katekin dengan cara menurunkan jumlah dari senyawa hidroksil bebas dalam katekin yang berdampak pada penurunan kapasitas pemusnah (*scavenging*) radikal (Kanakis *et al.*, 2011). Maka untuk dapat menjelaskan aktivitas antioksidan dari interaksi protein susu dan polifenol teh, metode yang digunakan adalah analisis spektroskopi jenis FTIR (*Fourier-transform infrared spectroscopy*) dan fluoresensi untuk menganalisis terlebih dahulu karakterisasi struktural dari interaksi tersebut.

Hasni *et al.*, (2011), menganalisis secara struktural interaksi katekin teh (C, EC, EGC, dan EGCg) dengan protein susu (α dan β kasein). Hasil dari FTIR dengan bilangan gelombang 4000-600 cm^{-1} dan resolusi 2 cm^{-1} menunjukkan peningkatan intensitas pita amida I dan II pada kompleksasi polifenol (dengan konsentrasi 0,125mM) disebabkan oleh terjadinya ikatan polifenol dengan protein pada grup C = O, C-N, dan N-H membentuk interaksi hidrofilik. Kemudian ketika konsentrasi polifenol ditingkatkan menjadi 0,5 mM maka intensitas pita amida I dan II menurun dikarenakan struktur heliks protein mengalami penurunan saat konsentrasi polifenol tinggi. Kemudian pada metode uji fluoresensi menunjukkan nilai *binding constant* pada interaksi protein susu dengan polifenol dengan ukuran besar bernilai lebih besar dibandingkan interaksi protein susu dengan polifenol dengan ukuran kecil. Hal ini disebabkan karena terdapat gugus OH lebih banyak pada polifenol dengan ukuran besar. Maka urutan ikatan terbesar hingga terkecil berdasarkan gugus OH adalah C- EC < EGC < EGCg.

Selain interaksi dengan kasein dari susu, penelitian interaksi polifenol teh dengan β -laktoglobulin sudah pernah dilakukan untuk menganalisis karakteristik struktur serta efek yang timbul dari interaksi tersebut (Kanakis *et al.*, 2011). Bahan uji polifenol yang digunakan berupa C, EC, ECg, dan EGCg yang kemudian dicampurkan ke dalam larutan protein. Metode yang digunakan untuk menganalisis struktur interaksi dan *binding affinity* adalah FTIR dan fluoresensi. Pada metode FTIR dilakukan dua kali uji coba interaksi polifenol dengan protein susu dengan konsentrasi polifenol teh yang berbeda pada gambar 2. Hasil pertama saat konsentrasi polifenol teh sebesar 0,125mM yang berinteraksi dengan protein susu diamati pada intensitas spektra protein pita amida I dan II 1661,1516 (C- β -LG), 1650, 1514 (EC- β -LG), 1631, 1536 (ECG- β -LG) dan pada 1630, 1538 cm^{-1} . Uji kedua, peningkatan dalam konsentrasi polifenol sebesar 0,5mM menunjukkan intensitas spektra protein pita amida I dan II mengalami kenaikan pula pada 1665, 1513 (C- β -LG),

1654, 1515 (EC- β -LG), 1630, 1540 (ECG- β -LG) dan pada 1630,1532 cm^{-1} (EGCg- β -LG). Peningkatan pita amida menandakan terjadi peningkatan struktur protein α -helix dan β -sheet pada konsentrasi polifenol tinggi.



Gambar 2. Spektrum FTIR Kompleks Polifenol- β laktoglobulin dengan Konsentrasi Polifenol yang Berbeda (Kanakis *et al.*, 2011)

Analisis secara kuantitatif juga diperoleh dari uji FTIR yang terlampir pada Tabel 4. menunjukkan bahwa terjadi perubahan struktur lebih besar pada β -sheet dibandingkan α -helix, pada interaksi polifenol teh dengan β -laktoglobulin. Perubahan struktur dari β -sheet lebih terlihat jelas jika berinteraksi dengan ECg dan EGCg dibandingkan C dan EC, hal ini dikarenakan struktur polifenol ECg dan EGCg lebih besar.

Tabel 4. Analisis Struktur Kedua dari Kompleks β -laktoglobulin dan Polifenol (Kanakis *et al.*, 2011)

Amide components (cm^{-1})	I Free β -LG (%)	0.25 mM β -LG	C- β -LG (%) 0.5 mM	EC- β -LG (%) 0.5 mM	ECG- β -LG (%) 0.5 mM	EGCG- β -LG (%) 0.5 mM
1692-1680 β -anti	23 \pm 1	13 \pm 1	15 \pm 1	6 \pm 1	7 \pm 1	
1680-1660 turn	14 \pm 1	20 \pm 3	13 \pm 1	16 \pm 1	13 \pm 1	

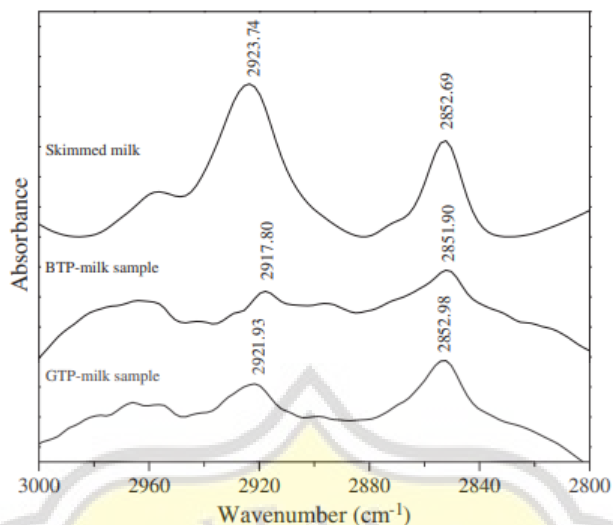
1660-1650 α -helix	12 \pm 1	14 \pm 3	15 \pm 1	13 \pm 2	15 \pm 1
1640-1610 β -sheet	51 \pm 1	53 \pm 2	57 \pm 1	65 \pm 2	64 \pm 2

Nilai konstanta kesetimbangan (*Binding constants, K-Fluorescence*) diperoleh dalam uji fluoresensi yang menunjukkan bahwa EGCg yang berinteraksi dengan β -laktoglobulin memiliki nilai K. Interaksi dengan EGCg memiliki nilai paling besar $13,4 (\pm 0,8) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ dikarenakan paling banyak memiliki gugus OH yang berkaitan dengan bentuk polifenol yang besar. Hasil penelitian ini sesuai dengan Hasni *et al.*, (2011), yang menunjukkan polifenol yang memiliki nilai konstanta kesetimbangan terbesar hingga terkecil dengan protein susu adalah $\text{EGCg} > \text{ECg} > \text{EC}$ yang terlampir pada Tabel 5.

Tabel 5. Hitungan Nilai Konstanta Kesetimbangan (K) untuk Kompleks Polifenol- β -laktoglobulin dan Jumlah Polifenol Terikat (n) per Molekul β -laktoglobulin (Hasni *et al.*, 2011)

Kompleks	<i>K-Fluorescence</i> (10^3M^{-1})	<i>n</i>
C- β -LG	2.2 \pm 0.8	1.1 \pm 0.04
EC- β -LG	3.2 \pm 1.0	0.9 \pm 0.08
ECG- β -LG	11 \pm 0.6	0.9 \pm 0.07
EGCG- β -LG	13.4 \pm 0.8	1.3 \pm 0.06

Penelitian terakhir mengenai analisis struktural dilakukan pada interaksi kasein dari susu UHT (*Ultra High Temperature*) dan polifenol dari teh hijau dan teh hitam menggunakan metode FTIR dan kombinasi fluoresensi dan ORAC (Ye *et al.*, 2013). Metode FTIR menggunakan bilangan gelombang $3000\text{-}2800 \text{ cm}^{-1}$ yang ditetapkan pada ikatan metilena (CH_2). Gambar 3 menunjukkan hasil interaksi polifenol teh hijau dan hitam dengan protein susu. Hasil spektrum FTIR menunjukkan interaksi teh hitam dengan susu mengalami lebih banyak pengurangan pada intensitas nilai absorbansi dibandingkan teh hijau dengan susu. Hal tersebut dikarenakan interaksi antara polifenol teh hitam dengan protein susu lebih bersifat hidrofobik. Interaksi hidrofobik yang kuat terjadi karena adanya akomodasi untuk cincin aromatik dari polifenol teh di daerah hidrofobik protein.



Gambar 3. Spektrum FTIR untuk Sampel Susu skim, BTP (Black Tea Polyphenol) dan GTP (Black Tea Polyphenol) dengan susu (Ye *et al.*, 2013)

Kemudian diuji menggunakan metode ORAC untuk aktivitas antioksidan dengan senyawa radikal bebas AAPH, mekanisme yang akan terjadi adalah antioksidan mentransfer atom hidrogen agar radikal bebas dapat direduksi. Hasil menunjukkan seiring dengan penambahan konsentrasi teh hitam atau teh hijau maka persen *masking* dari nilai ORAC akan meningkat. Ketika konsentrasi polifenol teh meningkat maka molekul polifenol teh akan lebih mudah menembus ke dalam bagian internal misel kasein dan lebih mudah ke daerah hidrofobik. Protein kasein dari susu memiliki sifat hidrofobik karena memiliki muatan yang cukup tinggi dengan banyak kandungan prolin dan sedikit residu sistin, hal tersebut menjadikan kasein cenderung berasosiasi dengan protein lain (Yuksel *et al.*, 2010). Senyawa polifenol teh hitam lebih banyak mengandung struktur terkonjugasi dibandingkan teh hijau, maka senyawa polifenol teh hitam memiliki interaksi hidrofobik lebih kuat sehingga persen *masking*nya sebesar 54,3% lebih tinggi dibandingkan polifenol teh hijau sebesar 17.3%.

3.2 Pengaruh Bahan Uji Jenis Susu terhadap Aktivitas Antioksidan

Penelitian mengenai interaksi polifenol teh dengan susu telah dilakukan untuk mengetahui dampak pada aktivitas antioksidan dan bioaksesibilitas polifenol dalam minuman *milk tea*. Beberapa jenis bahan uji dari komponen susu yang digunakan sebagai representasi protein adalah α -kasein, β -

kasein, β -laktoglobulin atau lemak serta berbagai jenis susu seperti susu pasteurisasi dan susu skim. β -laktoglobulin merupakan salah satu komponen dari protein *whey* dengan persentase 50%. Sedangkan α -kasein dan β -kasein adalah dua komponen dari kasein yang merupakan protein *insoluble* dari susu (Susanti & Hidayat, 2016).

Penambahan susu dalam teh saat konsumsi akan menimbulkan efek terhadap kandungan katekin setelah berinteraksi dengan enzim dalam pencernaan manusia. Efek yang terjadi adalah kandungan katekin setelah melalui sistem pencernaan (lambung dan usus) mengalami kenaikan namun jika tanpa tambahan susu kandungan katekin akan menurun (Qie *et al.*, 2021). Penelitian yang membandingkan interaksi antara senyawa katekin teh dengan protein susu atau enzim pencernaan dilakukan secara *in vitro*. Bahan uji yang digunakan sebagai protein susu adalah β -kasein (β -CN) dan β -laktoglobulin (β -Lg) dengan perbandingan rasio antara larutan teh : larutan susu adalah 2:3 sedangkan enzim pencernaan yang digunakan adalah pepsin dan tripsin. Uji yang dilakukan untuk mengukur aktivitas antioksidan kedua interaksi adalah FRAP dan ABTS. Hasil dari kedua uji tersebut menunjukkan bahwa terjadi kenaikan secara signifikan terhadap aktivitas antioksidan pada kondisi setelah pencernaan usus saat ditambahkan β -CN dan β -Lg yang terlampir pada Tabel 6. Ketika aktivitas antioksidan meningkat maka bioaksesibilitas katekin teh juga meningkat. Nilai aktivitas antioksidan pencernaan lambung yang lebih tinggi dibandingkan pada pencernaan usus disebabkan karena senyawa katekin teh lebih stabil pada pH asam seperti kondisi dalam lambung dibandingkan pH sedikit basa pada pencernaan usus.

Tabel 6. Nilai ABTS dan FRAP (Qie *et al.*,2021)

Sampel	ABTS (μ M TEAC/ L)			
	Sebelum pencernaan	Setelah pencernaan lambung	Setelah pencernaan usus	
EGCg	Pepsin/ tripsin	5023.7 \pm 15.3 ^b	4530.3 \pm 30.6 ^d	923.7 \pm 15.3 ^e
	β -Lg + pepsin / tripisin	4933.77 \pm 5.8 ^d	5107.0 \pm 10.0 ^a	5397.0 \pm 10.0 ^a
	β -CN + pepsin / tripisin	4890.3 \pm 15.3 ^e	4903.7 \pm 11.5 ^b	1913.7 \pm 5.8 ^c
EGC	Pepsin/ tripsin	2910.3 \pm 5.8 ^b	2640.3 \pm 35.1 ^d	1433.7 \pm 30.6 ^e
	β -Lg + pepsin / tripisin	2840.3 \pm 20.8 ^d	3200.3 \pm 20.8 ^a	4230.3 \pm 47.3 ^a
	β -CN + pepsin / tripisin	2830.3 \pm 20.8 ^d	2990.3 \pm 11.5 ^b	2643.7 \pm 25.2 ^b
EC	Pepsin/ tripsin	2230.3 \pm 15.3 ^b	2097.0 \pm 20.0 ^d	863.7 \pm 15.3 ^d
	β -Lg + pepsin / tripisin	2153.7 \pm 5.8 ^d	2627.0 \pm 26.5 ^a	3737.0 \pm 17.3 ^b
	β -CN + pepsin / tripisin	1977.0 \pm 10.0 ^f	2420.3 \pm 15.3 ^b	3847.0 \pm 20.0 ^a
FRAP (μ M TEAC/ L)				

Sampel		Sebelum pencernaan	Setelah pencernaan lambung	Setelah pencernaan usus
EGCg	Pepsin/ tripsin	1416.5 ± 9.5 ^b	1124.1 ± 4.5 ^d	287.8 ± 1.8 ^e
	β-Lg + pepsin / tripsin	1370.2 ± 2.8 ^e	1208.4 ± 3.8 ^b	695.1 ± 3.6 ^a
	β-CN + pepsin / tripsin	1362.4 ± 1.8 ^f	1155.1 ± 3.6 ^c	295.7 ± 2.1 ^d
EGC	Pepsin/ tripsin	842.3 ± 4.5 ^b	737.7 ± 4.5 ^c	387.8 ± 3.6 ^e
	β-Lg + pepsin / tripsin	812.7 ± 2.8 ^d	815.7 ± 2.8 ^a	550.2 ± 5.6 ^a
	β-CN + pepsin / tripsin	800.5 ± 5.5 ^e	783.6 ± 3.8 ^b	406.6 ± 3.8 ^c
EC	Pepsin/ tripsin	635.1 ± 6.6 ^b	522.4 ± 1.8 ^c	283.6 ± 2.8 ^d
	β-Lg + pepsin / tripsin	618.7 ± 1.8 ^d	573.9 ± 2.1 ^a	474.5 ± 3.8 ^b
	β-CN + pepsin / tripsin	602.4 ± 1.8 ^f	530.8 ± 2.1 ^b	487.8 ± 4.8 ^a

Tabel 6. menunjukkan hasil aktivitas antioksidan dari interaksi EGCg, EGC, dan EC dengan enzim pencernaan dan protein susu mengalami peningkatan yang jika dibandingkan, interaksi dengan β-Lg menunjukkan peningkatan yang lebih besar dibandingkan β-CN kecuali pada interaksi yang berikatan dengan EC. Hal ini dikarenakan kompleks katekin dan β-Lg akan dihidrolisis oleh tripsin untuk melepaskan katekin teh sehingga dapat meningkatkan kapasitas antioksidannya.

Uji interaksi jenis susu pasteurisasi dengan katekin teh hitam dan hijau juga sudah dilakukan dengan metode uji aktivitas antioksidan yang sama yaitu FRAP (Leenen *et al.*, 2000). Hasil menunjukkan bahwa penambahan susu pasteurisasi pada teh tidak memengaruhi efek dari peningkatan aktivitas antioksidan. Hasil yang serupa didapatkan oleh Reddy *et al.*, (2005) yang mengungkapkan penambahan susu pasteurisasi pada teh hitam tidak memengaruhi kapasitas antioksidan pada teh hitam. Kedua penelitian ini menggunakan metode uji aktivitas antioksidan yang sama yaitu FRAP dengan konsentrasi susu yang sama ditambahkan sebesar 20 % v/v, dengan perbandingan rasio antara larutan teh : larutan susu adalah 4:1. Terdapat dua sebab dari perbedaan hasil aktivitas antioksidan interaksi protein susu dengan polifenol teh, yaitu perbedaan penggunaan perbandingan rasio antara larutan teh : larutan susu antara ketiga penelitian yang akan dibahas khusus pada bab 4.3.

Komponen lain dari protein susu yang dapat berinteraksi dengan polifenol teh adalah α-kasein. Penelitian aktivitas antioksidan antara katekin teh dengan atau tanpa α-kasein dilakukan dengan uji ABTS (Bourassa *et al.*, 2013). Jenis katekin yang diuji dengan α-kasein adalah C, EC, EGC, ECg, EGCg, dan theaflavin. Hasil dari uji ABTS terlampir pada Tabel 7, bahwa penambahan α-kasein berpengaruh negatif terhadap seluruh senyawa katekin teh dengan nilai terbesar dari

theaflavin sebesar -28% dikarenakan jumlah gugus OH dan bentuk polifenol terbesar dari theaflavin yang dipengaruhi oleh keberadaan α -kasein. Hal ini juga menunjukkan bahwa polifenol akan berinteraksi dengan protein melalui gugus OH pereduksi dan menunjukkan kontak polar dengan ikatan hidrogen.

Tabel 7. Nilai Rata-rata TEAC Polifenol dengan atau tanpa Kasein (μM) (Bourassa *et al.*, 2013)

$\mu\text{M TEAC} \pm$ SD	C	EC	EGC	ECG	EGCG	Theaflavin s
<i>Without casein</i>	3.13 \pm 0.03	3.80 \pm 0.08	4.95 \pm 0.15	6.77 \pm 0.12	7.29 \pm 0.09	2.37 \pm 0.04
<i>With α-casein</i>	3.08 \pm 0.06(2.43)	3.59 \pm 0.18 (2.94)	5.07 \pm 0.14 (4.42)	6.66 \pm 0.11 (6.01)	7.36 \pm 0.17(6.71)	2.36 \pm 0.04 (1.71)
<i>Variation (%)</i>	-22	-23	-11	-11	-8	-28

Makronutrien lain yang berasal dari komponen susu telah diteliti oleh Rashidinejad *et al.*, (2016) mengenai interaksi antara katekin teh hijau dengan globular lemak susu. Penelitian ini menggunakan bahan uji katekin yaitu EGC, C, EGCg, EC, dan ECg yang akan dikombinasikan dengan kadar lemak sebesar 4% dari susu sapi segar. Metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah FRAP sedangkan untuk menentukan interaksi antara katekin dan lemak menggunakan FTIR. Hasil penelitian dari FRAP menunjukkan interaksi membran globular lemak susu (*Milk Fat Globule Membrane / MFGM*) dengan katekin menurunkan aktivitas antioksidan dengan nilai absorbansi dari MFGM. Jenis ikatan yang terjadi pada interaksi antara katekin dan *lipid bilayer* yaitu melalui ikatan hidrogen (gugus OH dengan katekin galat) melalui adsorpsi atau penyerapan ke dalam lapisan ganda lipid. Seluruh jenis senyawa katekin yang terkandung dalam teh hijau dapat berinteraksi dengan fosfolipid pada permukaan bilayer namun EGCg dan ECg akan berinteraksi lebih kuat dikarenakan memiliki lebih banyak gugus hidroksil dan kelompok galat dibandingkan EC dan EGC. Metode FTIR pada penelitian ini menggunakan bilangan gelombang 3000-2800 cm^{-1} , dengan perbedaan spektrum antara lemak susu kontrol dan lemak susu dengan katekin sebesar 2920 cm^{-1} . Berdasarkan literatur mengenai hasil FTIR, pita yang berada disekitar 2900 cm^{-1} berkaitan dengan bagian model C-H dari CH_2 dan CH_3 . Maka hasil dari pergeseran spektra lemak susu kontrol dari 2924 cm^{-1} menjadi 2918-20 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan hidrofobik dalam kompleks katekin dan lemak melalui cincin fenol

dari molekul katekin dan kantong hidrofobik dari membran globular lemak.

Berdasarkan empat jurnal yang diulas diatas dan beberapa jurnal terdahulu, pada umumnya peneliti menggunakan dua jenis susu yang berbeda antara susu *full fat* dan susu skim menunjukkan hasil yang berbeda. Sedangkan sebuah teori mengatakan bahwa efek dari penambahan jenis susu *full fat* dan skim tidak berbeda secara signifikan dikarenakan perbedaan hasil ditentukan oleh perbedaan fraksi protein (misel kasein) (Kilmartin & Hsu, 2003). Pernyataan tersebut diperkuat dengan hasil penelitian bahwa lemak susu hanya berikatan dengan senyawa polifenol tanpa memberikan efek terhadap aktivitas antioksidan (Langley-evans, 2000). Namun penelitian Ye *et al.*, (2013) menyimpulkan bahwa kasein susu merupakan penyebab utama dari penurunan aktivitas antioksidan. Hasil dari aktivitas antioksidan yang berbeda telah diteliti dalam sebuah jurnal penelitian menggunakan susu skim oleh Dubeau & Samson (2010) yang memberikan dua hasil berbeda dari tiga uji yang berbeda yaitu ABTS, *Voltammetry*, dan lipid peroksidasi. Hasil pada metode ABTS dan *Voltammetry* menunjukkan adanya penurunan kapasitas antioksidan pada teh polifenol sedangkan pada metode lipid peroksidasi menunjukkan bahwa peningkatan kapasitas antioksidan. Hasil kapasitas antioksidan yang berbeda disebabkan oleh penggunaan metode yang berbeda untuk mengukur kapasitas antioksidan yang berkaitan dengan makronutrien protein dan lemak yang akan dibahas lebih lanjut pada bab 4.4.

Tabel 8. Potensi Antioksidan Teh hitam dengan Tambahan Susu (Leenen *et al.*, 2000)

<i>Tea preparation</i>	<i>Observed FRAP</i>	<i>Expected FRAP</i>	<i>% reduction</i>
<i>No milk</i>	638 ± 11	-	-
<i>Whole cow's milk</i>	693 ± 44	962	28
<i>Skimmed cow's milk</i>	696 ± 72	788	12
<i>Semi-skimmed cow's milk</i>	724 ± 68	930	22
<i>Soya milk</i>	745 ± 55	910	18

Pada Tabel 8. memperkuat hasil penelitian interaksi antara polifenol dengan lemak pada susu yang menunjukkan nilai persen penurunan potensi antioksidan paling besar adalah interaksi teh dengan susu murni atau susu dengan lemak. Sementara interaksi susu skim dengan teh memiliki nilai persen penurunan potensi antioksidan paling kecil dibandingkan empat jenis susu lainnya (Leenen *et al.*, 2000).

3.3 Pengaruh Penambahan Konsentrasi Susu terhadap Aktivitas Antioksidan

Jumlah kadar yang digunakan untuk bahan uji oleh masing-masing penelitian menjadi salah satu penyebab berbedanya hasil efek aktivitas antioksidan seperti yang terlampir pada Tabel 9.

Tabel 9. Perbandingan Konsentrasi Teh dan Susu terhadap Aktivitas Antioksidan

No	Kadar		Perbandingan	Efek pada Aktivitas Antioksidan	Referensi
	Teh	Protein Susu			
1	0,6 mg/ml	0,9 mg/ml	2 : 3	Menurunkan	(Qie <i>et al.</i> , 2021)
2	240 ml	60 ml	4 : 1	Tidak berpengaruh	Leenen <i>et al.</i> , 2000
3	280 ml	70 ml	4 : 1	Tidak berpengaruh	Reddy <i>et al.</i> , 2005
4	60 ml	40 ml	3 : 2	Menurunkan	Sharma <i>et al.</i> , 2008

Serafini *et al.*, (1996) menyatakan bahwa penambahan standar 10-15 % susu tidak akan mempengaruhi aktivitas antioksidan kemudian didukung dengan penelitian lain (Gardner *et al.*, 1998) yang juga telah membuktikan dalam penelitiannya secara *in vitro* bahwa aktivitas antioksidan akan berkurang jika rasio antara susu dengan teh adalah 1:1, dengan jenis susu *full cream* atau skim. Pada tabel 12. menunjukkan kadar susu yang digunakan dalam penelitian Qie *et al.*, (2021) dan Sharma *et al.*, (2008) masing-masing adalah 60% dan 40%, melebihi penambahan standar susu dengan hasil menurunkan aktivitas antioksidan. Sementara hasil dari penelitian Leenen *et al.*, (2000) dan Reddy *et al.*, (2005) dengan kadar susu masing-masing 10% menunjukkan bahwa penambahan susu tidak mempengaruhi aktivitas antioksidan.

Pengaruh penambahan konsentrasi susu yang semakin besar pada teh sesuai dengan teori dari (Mcmanus *et al.*, 1985) yang menyatakan jika pada konsentrasi protein tinggi maka interaksi lebih bersifat hidrofobik antara protein dan polifenol maka ikatan yang terjadi juga lebih kuat dibandingkan protein dengan konsentrasi rendah. Maka hasil beberapa penelitian sesuai dengan teori bahwa konsentrasi protein mempengaruhi hasil aktivitas antioksidan karena terjadi ikatan yang lebih kuat.

3.4 Pengaruh Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Salah satu penyebab dari perbedaan hasil aktivitas antioksidan dari bahan uji susu protein dan lemak, dapat terjadi karena perbedaan metode uji aktivitas antioksidan yang digunakan. Pada umumnya metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan antara lain : FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), ABTS (uji 2,20 -Azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), *Voltammetry*, Peroksidasi lipid, DPPH (uji [2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl]), dan uji ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*).

Pada penelitian oleh Debeau & Samson (2010) menguji kapasitas antioksidan dari interaksi susu skim dengan dua jenis teh hitam dan satu jenis teh hijau dengan tiga metode berbeda. Salah satu metode yang digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan adalah uji ABTS atau disebut juga sebagai metode TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*) (Munteanu & Apetrei, 2021) dengan hasil pada tabel 10. (Debeau & Samson, 2010) Nilai kapasitas antioksidan yang sudah dinormalisasi menurut rata-rata kandungan polifenol yang setara dengan asam tanat (Tannic Acid Equivalent / TAE) per gram daun teh kering menunjukkan bahwa teh Darjeeling dan hijau lebih efektif dalam memusnahkan radikal ABTS dibandingkan teh *English breakfast*. Hal ini dikarenakan teh *English breakfast* termasuk dalam jenis teh hitam yang memiliki konsentrasi katekin monomer lebih rendah dibandingkan teh hijau karena proses fermentasi.

Tabel 10. Nilai Rata-rata Kapasitas Antioksidan Teh dengan dan tanpa Susu dengan Metode ABTS dan Voltammetry (Dubeau & Samson, 2010)

		Darjeeling	English breakfast	Hijau
ABTS	Tanpa susu	14.2	3.97	12.2
	Dengan susu	13.0	3.19	11.5
<i>Voltammetry</i>	Tanpa susu	7.44	2.33	5.94
	Dengan susu	5.38	0.55	3.80
Peroxidasi lipid	Tanpa susu	4.05	3.47	3.41
	Dengan susu	4.46	3.90	4.06

Hasil efektifitas antioksidan dengan metode *voltammetry* ditemukan sesuai dengan metode ABTS dengan hasil pada Tabel 10. Teh hijau dan Darjeeling memiliki efektivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan teh *English breakfast*, dengan atau tanpa tambahan susu. Sedangkan hasil dari

peroksidasi lipid menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kapasitas antioksidan pada setiap jenis teh dengan teh hijau memiliki kenaikan paling besar. Hasil yang berbeda terjadi berdasarkan jenis substrat yang digunakan dan kondisi fisik pada sebuah metode uji aktivitas antioksidan. Metode ABTS dan *voltammetry* dilakukan dengan membuat reaksi terjadi dalam larutan atau kondisi padat-cair sementara peroksidasi lipid dilakukan dengan membuat reaksi dalam *oil-in-water*.

Selain kedua faktor tersebut, antara metode ABTS dan *voltammetry* terjadi penurunan kapasitas yang lebih besar dari metode *voltammetry* disebabkan kompleks antara protein susu dengan polifenol teh terbentuk di dekat permukaan elektroda sehingga menghambat oksidasi polifenol teh. Selain itu nilai Q_{400} dari metode *voltammetry* memiliki efek *masking* empat kali lebih besar dibandingkan efek *masking* yang dihasilkan oleh metode ABTS. Maka pada metode ABTS mempunyai kemungkinan lebih kecil untuk berinteraksi dengan permukaan elektroda daripada dengan radikal bebas ABTS yang larut. Sementara metode peroksidasi lipid dengan hasil yang bertentangan dengan kedua metode sebelumnya menjelaskan bahwa kenaikan aktivitas antioksidan disebabkan karakteristik kasein dari susu yang bersifat amfifilik sehingga memungkinkan kompleks polifenol-kasein secara istimewa memisahkan misel lipid-air dalam emulsi *oil-in-water* yang merupakan kondisi dari metode peroksidasi lipid. Pada tabel 13. terlampir bahwa teh *English breakfast* memiliki peningkatan efisiensi antioksidan terbesar dikarenakan memiliki tingkat hidrofobisitas yang tinggi sehingga dapat memfasilitasi bagian sisi lipid yang dapat digabungkan dengan antioksidan lipofilik.

Jenis metode berikutnya yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan adalah FRAP, ORAC, dan DPPH. Ketiga metode tersebut menggunakan sebuah teknik yang sama dalam mengukur aktivitas antioksidan yaitu dengan spektrometri (Munteanu & Apetrei, 2021). Perbedaan dari ketiga metode tersebut adalah prinsip kerja, FRAP reaksi antioksidan dengan kompleks Fe (III) dengan hasil pengukuran berupa kolorimetri, ORAC Reaksi antioksidan dengan peroxy radikal yang diinduksi oleh 2,20-azobis-2-amidino-propana (AAPH) dengan hasil pengukuran berupa berkurangnya fluoresensi fluorescein, dan DPPH reaksi antioksidan dengan radikal organik dengan hasil pengukuran berupa kalorimetri. Pada penelitian Rashidinejad *et al.*,(2016) menggunakan gabungan metode ORAC dan FRAP untuk menghitung pemulihan katekin dari gumpalan lemak susu