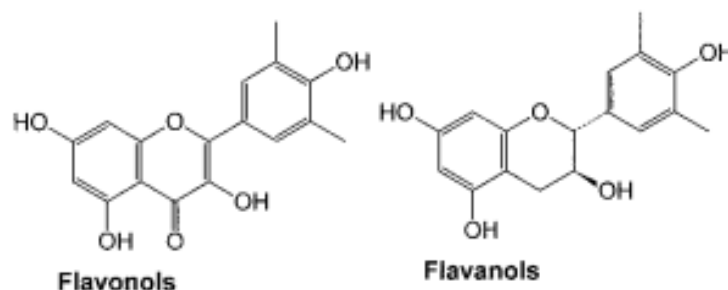


4. INTERAKSI SENYAWA ANTIOKSIDAN TEH DENGAN MAKRONUTRIEN SUSU DALAM TUBUH

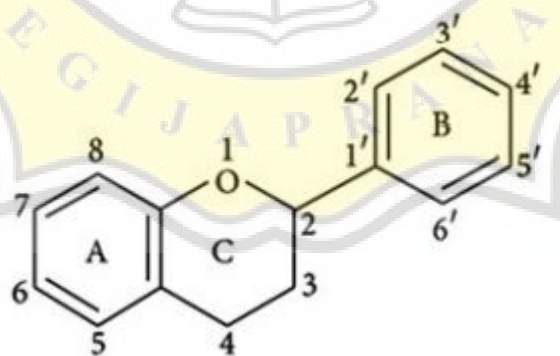
Makronutrien memiliki peran penting untuk memenuhi kebutuhan energi sehari-hari manusia. Teh yang mengandung banyak antioksidan dari senyawa polifenol dalam tubuh dapat berinteraksi dengan senyawa makronutrien yang akan menimbulkan efek kesehatan tertentu pada tubuh. Efek dari interaksi kedua senyawa tersebut dapat terasa jika senyawa polifenol yang sudah masuk ke dalam tubuh tercerna dan terserap dalam jumlah tertentu. Jenis interaksi dari makronutrien protein dipengaruhi oleh ikatan non-kovalen yang terbentuk dalam aktivitas pemusnah radikal yang mengalami pengurangan jika tanpa tambahan susu dalam pencernaan protein dalam tubuh dengan senyawa polifenol teh. Interaksi antara kedua senyawa polifenol dengan makronutrien dapat mempengaruhi atau meningkatkan bioavailabilitas dan bioaksesibilitas polifenol (Jakobek, 2015). Proses dari bioaksesibilitas bergantung pada terjadinya bioavailabilitas yang terjadi setelah penyerapan makanan ke dalam darah (Swallah *et al.*, 2020).

Jenis klasifikasi senyawa polifenol teh yang banyak dikaji oleh para peneliti terdahulu berasal dari golongan flavonoid, pada umumnya dibagi menjadi dua subkelas yaitu flavanols dan flavonols yang tertera pada gambar 4 . Kandungan golongan flavanol atau biasa disebut flavan-3-ols pada teh cukup tinggi yang dibedakan menjadi bentuk monomer, oligo-, dan polimer. Golongan monomer flavanol terdiri dari epigallocatechin gallate (EGCg), epicatechin gallate (ECg), epigallocatechin (EGC), catechin, galocatechin, dan epicatechin. Perubahan bentuk flavanol monomer menjadi oligo- dan polimer disebabkan karena polimerisasi akibat proses autoksidasi atau terjadinya katalisis oleh enzim polifenol oksidase (PPO). Perubahan bentuk flavanol terjadi pada proses pembuatan teh hitam karena melalui tahap fermentasi sehingga mengalami pengurangan dalam jumlah besar. Contoh senyawa polimer flavanol adalah proanthocyanidin, theaflavins, dan thearubigins. Sementara untuk golongan flavonol terdiri dari quercetin, kaempferol, dan myricetin (Hollman & Arts, 2000).



Gambar 4. Struktur Kimia dari Flavonol dan Flavanol (Hollman & Arts, 2000)

Flavonoid terdiri dari 15 rangka karbon, struktur flavonoid memiliki sebuah cincin benzena (A), terkondensasi oleh enam membrane heterosiklik piron atau cincin piron (C), yang kemudian di posisi 2 atau 3 memuat cincin fenil (B) sebagai substituent, digambarkan pada Gambar 5. Aktivitas antioksidan dan anti-radikal dari flavonoid akan terjadi jika ada ikatan rangkap pada C2-C3 di cincin C, sebuah gugus dihidroksil (tipe katekol) atau tiga gugus hidroksil saling berdekatan (tipe pirogalol) pada cincin B, dan adanya C5 dan C7 pada gugus hidroksil pada cincin A (Taylor *et al.*, 2012). Golongan flavonoid dan makronutrien protein, karbohidrat, dan lemak akan berinteraksi dan membentuk ikatan secara non-kovalen untuk memberikan potensi kesehatan bagi tubuh manusia (Bordenave *et al.*, 2014). Ikatan non-kovalen dibagi menjadi 5 jenis yaitu ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, interaksi van der Waals, interaksi hidrofobik, dan ikatan π (Ozdamar *et al.*, 2018). Interaksi protein dengan flavonoid sudah banyak dibahas oleh para peneliti terdahulu sementara untuk karbohidrat dan lemak masih sedikit diulas.



Gambar 5. Struktur Dasar dari Flavonoid (Gonzales *et al.*, 2015)

Interaksi antara polifenol teh dengan makronutrien juga dapat berasal dari bahan tambahan pangan seperti susu atau gula. Konsumen memiliki cara yang beragam saat mengonsumsi teh yang

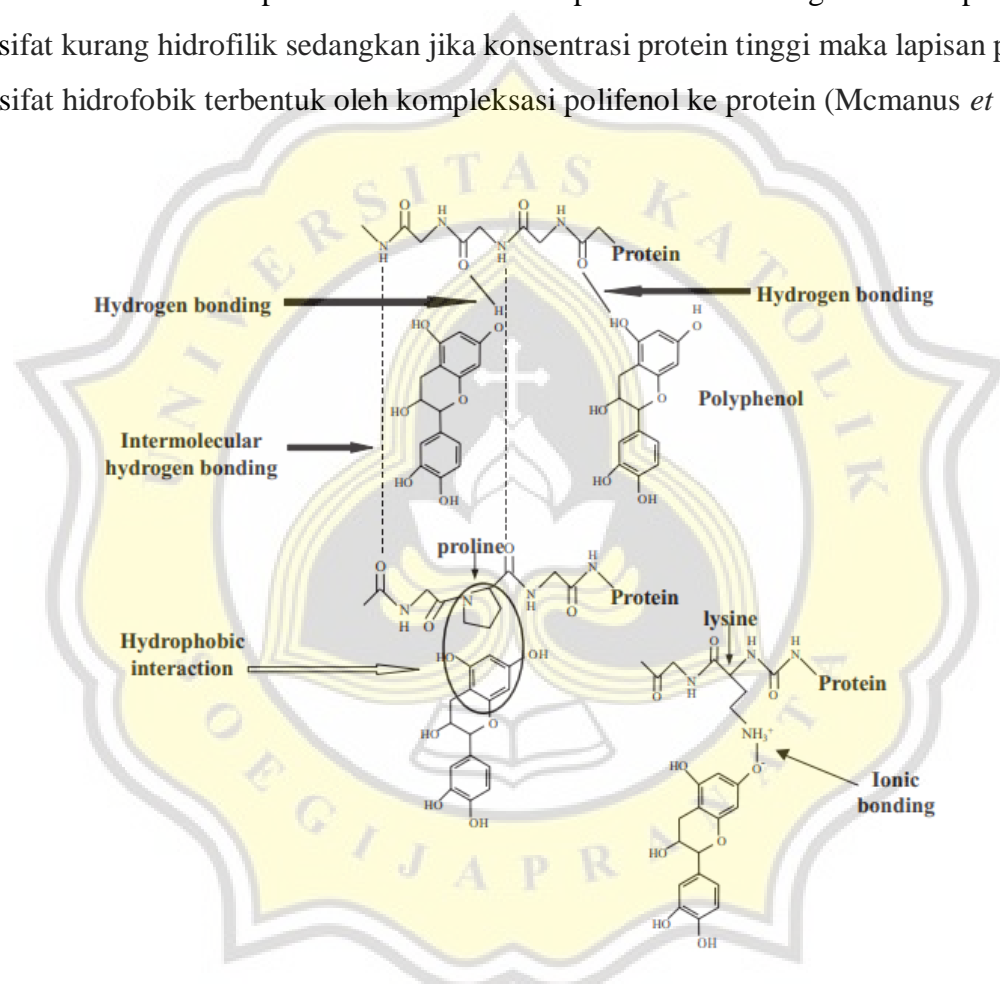
mempengaruhi efek dari aktivitas antioksidan, salah satunya dengan menambahkan susu atau gula. Tujuan dari penambahan susu atau gula pada umumnya untuk memperkaya cita rasa dari teh dan mengurangi efek *astringency*. Hasil dari interaksi antara protein dan polifenol teh dapat menyebabkan *astringency*. *Astringency* adalah persepsi sensori fisik seperti rasa kering, kesat, yang akan dirasakan setelah mengkonsumsi minuman atau buah yang mengandung banyak polifenol (Bandyopadhyay *et al.*, 2012). *Astringency* dapat dirasakan jika terjadi pengurangan sifat pelumas dari protein saliva dari rongga mulut yang terjadi ketika berinteraksi dengan polifenol dari teh. Efek kesehatan dari polifenol teh dapat berubah jika berinteraksi dengan sumber protein selain protein saliva. Penambahan susu dapat mempengaruhi *astringency* dari teh karena kemampuan kasein dalam susu, memiliki kandungan prolin yang tinggi untuk menyerap senyawa polifenol teh dalam misel kasein sehingga mengurangi interaksi antara polifenol dan protein saliva (Bennick, 2002). Namun penambahan susu dapat mengurangi efek dari polifenol teh yang dapat menghambat beberapa enzim di dalam pencernaan seperti α -amilase, pepsin, tripsin, dan lipase (He *et al.*, 2006).

4.1 Interaksi Protein dan Polifenol

Interaksi antara protein dan senyawa polifenol pada teh dalam penelitian terdahulu menunjukkan dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu struktur dari senyawa polifenol (polifenol dengan berat molekul tinggi akan mengikat protein lebih efektif), tipe dari protein (kemampuan protein mengikat polifenol bergantung pada ukuran protein, struktur kedua/ketiga, dan komposisi asam amino), temperatur, dan pH. Senyawa polifenol akan mengalami perubahan sifat jika berinteraksi dengan protein yang berdampak pada efek antioksidan dan bioavailabilitas (Ozidal *et al.*, 2018). Bentuk interaksi protein-polifenol dapat terjadi secara *reversible* dan *irreversible*.

Interaksi *reversible* biasanya berbentuk gaya non-kovalen seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan gaya van der Waals (Ozidal *et al.*, 2013). Pengertian ikatan hidrogen merupakan bentuk interaksi lemah antara atom elektron negatif (atom akseptor) dengan atom hidrogen yang terikat kovalen dengan atom donor. Interaksi hidrofobik merupakan kekuatan yang menyebabkan pelipatan makromolekul seperti protein sedangkan gaya van der Waals merupakan interaksi lemah dari dua atom yang berdekatan karena terjadinya dwikutub sementara (*transition dipole*) (Patrick, 2001). Interaksi hidrofobik didorong dengan adanya ikatan hidrogen pada sebuah reaksi. Interaksi

hidrofobik akan melibatkan cincin aromatik dari polifenol dan sisi hidrofobik dari protein, seperti cincin pirolidin dari residu prolil (Le Bourvellec, C., & Renard, 2012). Sementara ikatan hidrogen terjadi antara sisi akseptor dari protein dan gugus hidroksil dari polifenol yang diilustrasikan pada gambar 6. Asosiasi polifenol dengan protein yang bersifat *reversible* terjadi secara non spesifik di permukaan interaksi ikatan hidrogen dan hidrofobik. Ketika protein dan polifenol berinteraksi dengan kondisi pengendapan, ada dua kondisi yang mungkin terjadi. Pada konsentrasi protein rendah, polifenol berasosiasi pada satu atau lebih sisi protein untuk menghasilkan lapisan tunggal yang bersifat kurang hidrofilik sedangkan jika konsentrasi protein tinggi maka lapisan permukaan yang bersifat hidrofobik terbentuk oleh kompleksasi polifenol ke protein (Mcmanus *et al.*, 1985).



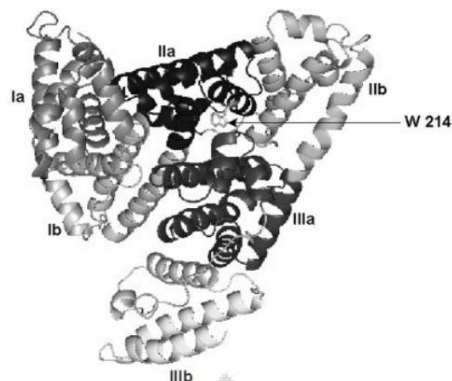
Gambar 6. Mekanisme Interaksi antara Protein dan Polifenol (Le Bourvellec, C., & Renard, 2012)

Sementara interaksi *irreversible* melalui dengan ikatan kovalen antara makromolekul dengan polifenol yang dapat dihasilkan dari oksidasi dan proses adisi nukleofilik. Interaksi *irreversible* terjadi ketika kondisi pH lebih besar atau sama dengan 7, yang berakibat pada penghambatan enzim (Le Bourvellec & Renard, 2012). Pada pencernaan lambung pH lebih asam dibandingkan

pH pada usus yang sedikit lebih basa, maka interaksi antara polifenol dengan protein bersifat *irreversible* namun setelah ikatan berada pada pencernaan usus interaksi akan bersifat *reversible*. Sehingga efek yang terjadi adalah nilai aktivitas antioksidan interaksi polifenol dengan protein pada pencernaan lambung lebih tinggi karena bersifat *irreversible* sementara pada pencernaan usus lebih bersifat *reversible* maka aktivitas antioksidan lebih rendah karena polifenol berinteraksi optimal dengan kondisi pH asam.

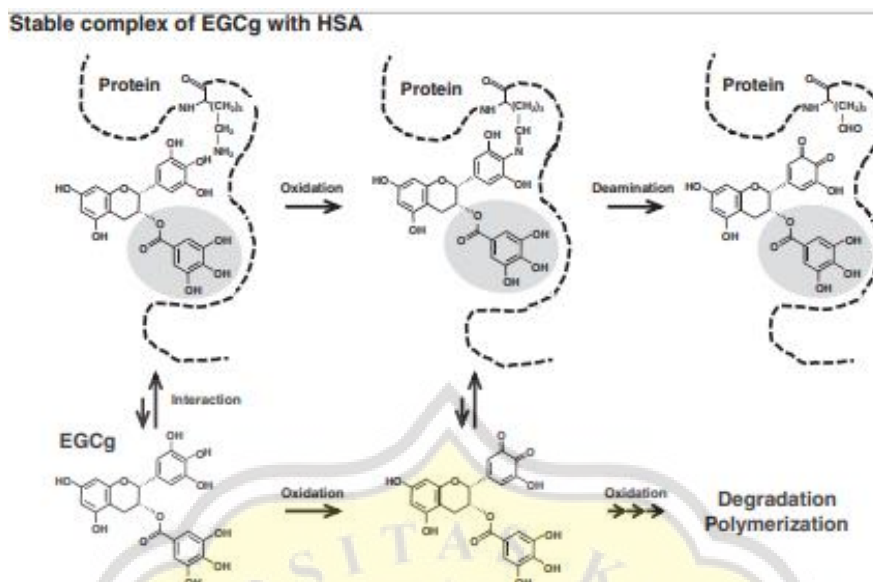
Flavonoid teh dalam pencernaan manusia, akan berinteraksi dengan protein albumin dalam darah untuk transportasi ke berbagai jaringan tubuh. Interaksi polifenol dengan protein dalam darah terjadi sangat kompleks karena melibatkan banyak molekul kecil seperti ion logam, glukosa, asam lemak, dan metabolisme dalam darah. Sehingga untuk meneliti interaksi antara polifenol dengan protein plasma para peneliti menggunakan salah satu komponen dari darah manusia, *Human Serum Albumin* (HSA) yang sudah banyak digunakan sebagai bahan uji afinitas dengan polifenol.

HSA merupakan protein dominan dalam darah, berfungsi sebagai transportasi utama yang berperan dalam kemanjuran obat dalam darah dengan cara mengikat ligan endogen dan eksogen (seperti nutrisi, hormon, asam lemak, dan obat-obatan termasuk golongan flavonoid) secara reversibel. *Serum albumin* merupakan plasma protein pokok yang sebagian besar berbentuk α -helix. Hasil bentuk HSA dengan analisis kristalografi terdiri dari tiga domain homolog (I, II, dan III) yang berkumpul menjadi molekul berbentuk hati. Bentuk molekul akan mengalami perubahan sebagai respon perubahan pH dan pengikatan ligan. HSA memiliki dua sisi pengikat spesifik ligan yaitu sisi pengikat Sudlow I (dalam subdomain IIA) dan II (dalam subdomain IIIA), yang terletak di sisi hidrofobik (Gambar 7.). HSA hanya memiliki satu jenis residu triptofan (Trp-214) dalam kantong pengikatan hidrofobik pada subdomain IIA, yang berkontribusi pada fluoresensi intrinsik protein. Maka dari itu, metode fluoresensi dengan mudah mendeteksi perubahan lingkungan mikro dari residu triptofan dan menentukan *binding affinity* (Trnková *et al.*, 2011).



Gambar 7. Representasi Human Serum Albumin (Trnková *et al.*, 2011)

Tingkat afinitas antara senyawa polifenol dengan HSA bergantung pada kondisi hidrofobitas yang berasal dari keberadaan gugus galoil dan peningkatan gugus hidroksil di cincin B pada senyawa katekin teh, yang merupakan faktor utama dalam memusnahkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Taylor *et al.*, 2012). HSA dapat mencegah oksidasi EGCg dengan aktivitas antioksidannya melalui reaksi reversibel. Senyawa katekin yang memiliki gugus galoil seperti EGCg akan terlindungi dari ion logam, O₂, dan ROS karena cincin B pada polifenol dilindungi oleh protein. Interaksi antara senyawa katekin dengan HSA dapat seimbang dikarenakan adanya ikatan hidrogen dan gaya elektrostatik dari grup fenol. Pembentukan kompleks antara HSA dengan EGCg adalah yang paling stabil diantara senyawa katekin lainnya karena menekan polimerisasi dan dekomposisi EGCg dengan mencegah oksidasi lebih lanjut (Shii *et al.*, 2011). Maka mekanisme stabilisasi EGCg oleh HSA yang melibatkan aktivitas antioksidatif HSA yang tampaknya terkait dengan penghambatan polimerisasi dan dekomposisi pada gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme yang Diusulkan untuk Stabilisasi EGCg oleh HSA (Shii *et al.*, 2011)

Metode pengukuran tingkat afinitas, pada umumnya menggunakan metode spektroskopi fluoresensi yang sudah digunakan banyak peneliti untuk memverifikasi interaksi protein dan polifenol. Fluoresensi merupakan metode dengan pemancaran radiasi cahaya oleh sebuah bahan uji setelah tereksitasi oleh cahaya berenergi tinggi. Hasil penelitian terdahulu ditunjukkan dalam Tabel 11. berupa interaksi antara senyawa polifenol dengan HSA sebagai berikut,

Tabel 11. Interaksi antara Senyawa Polifenol Teh dengan Human Serum Albumin

No	Jenis polifenol	Jenis Protein	Jenis Interaksi	Kesimpulan	Referensi
1.	EGCg	HSA	Ikatan hidrofobik, hidrogen dan van der Waals	Hasil penelitian menunjukkan bahwa EGCg adalah pemadam yang kuat dari fluoresensi HSA dan mengikat protein dengan afinitas tinggi.	Maiti <i>et al.</i> , 2006
2.	C, EC, GC,	HSA	Ikatan	Struktur yang paling	Trnková <i>et</i>

EGC, Cg, ECg, GCg, EGCg	hidrofobik dan hidrogen	berperan dalam interaksi dengan HSA adalah gugus galoil pada cincin-C, diikuti oleh jumlah gugus hidroksil pada cincin-B, dan spasial pengaturan (cis- dan trans-struktur)	dalam <i>al.</i> , 2011
3. EC, EGC, HSA EGCg	Ikatan hidrogen dan van der Waals	Katekin dari teh efisien dalam menghambat kerusakan oksidatif pada hemoglobin manusia dan HSA pada konsentrasi darah postprandial	(Özyurt & Estévez, 2016)

Hasil penelitian Maiti *et al* (2006) menyatakan telah terjadi penurunan intensitas fluoresensi secara bertahap yang menunjukkan bahwa interaksi antara HSA dengan EGCg sudah terdeteksi dengan metode fluoresensi. Perbedaan parameter suhu juga mempengaruhi konstanta kesetimbangan, ketika suhu meningkat maka konstanta akan menurun, peningkatan suhu berhubungan dengan perubahan struktur dari subdomain IIA yang memungkinkan Trp 214 lebih mudah untuk diakses. Kemudian interaksi antara HSA dan EGCg menghasilkan efek pendaran yang kuat dan tingkat afinitas tinggi.

Hasil dari analisis metode fluoresensi adalah konstanta kesetimbangan (*Binding constants*) dan jumlah sisi ikatan antara HSA dan bahan uji katekin (Trnková *et al.*, 2011). Pada penelitian ini, metode fluoresensi dikombinasikan dengan spektroskopi serapan UV-Vis dan metode elektroforesis dengan parameter pH 7.4 dan temperatur 37°C. Perbedaan karakteristik struktur dari

delapan jenis katekin menjadi fokus utama dalam bahasan *binding affinity* katekin dengan HSA, yaitu keberadaan golongan galolil pada cincin C, jumlah kelompok hidroksil pada cincin B, dan *spatial arrangement* (struktur *cis*- dan *trans*-). Contoh dari golongan katekin dengan gugus galoil di antaranya Cg, ECg, GCg, dan EGCg. Metode yang digunakan adalah *fluorescence quenching* intrinsik protein dengan triptofan digunakan untuk memperoleh hasil interaksi katekin dengan HSA yang lebih detail dengan pencatatan spektrum emisi fluoresensi sebesar 295 nm yang berkaitan dengan residu triptofan.

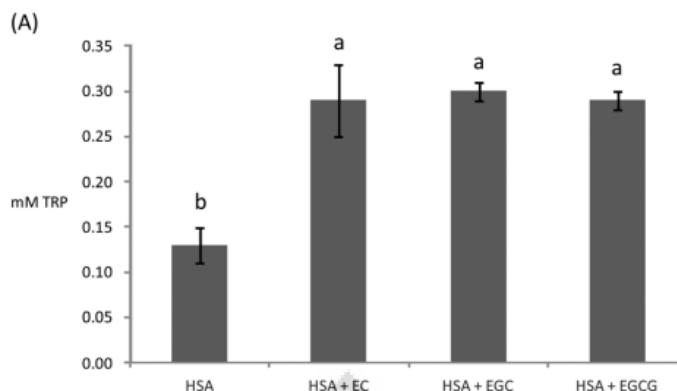
Hasil uji pada metode fluoresensi triptofan menunjukkan penurunan yang lebih nyata pada golongan katekin dengan gugus galoil dibandingkan golongan tanpa gugus galoil. Nilai konstanta pendinginan bimolekuler (K_q) menggambarkan efisiensi pendinginan atau aksesibilitas dari fluorofor ke pendingin. Katekin dengan golongan galoil (Cg, ECg, GCg, dan EGCg) memiliki nilai K_q lebih tinggi dibandingkan katekin tanpa golongan galoil (C, EC, GC, dan EGC). Kemudian, katekin galat dengan struktur 2,3-*cis* (ECg dan EGCg) memiliki nilai K_q lebih besar dibandingkan dengan golongan katekin galat dengan struktur 2,3-*trans* (Cg dan GCg). Selain nilai K_q , katekin dengan gugus galoil juga memiliki kemampuan mengikat lebih tinggi dibandingkan katekin tanpa gugus galoil. Hal tersebut menekankan peran gugus galoil juga penting pada cincin C karena dengan adanya pembentukan cincin aromatik dan tiga gugus hidroksil, akan membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Faktor terakhir yang berpengaruh pada *binding affinity* adalah deprotonasi dari gugus hidroksil dalam kedua molekul. Katekin yang tidak memiliki gugus galoil akan terprotonasi penuh dalam pengujian karena memiliki konstanta disosiasi lebih tinggi dari pH uji (pH 7.4), yaitu sebesar pH 9. Sedangkan katekin dengan gugus galoil pada cincin C memiliki nilai konstanta disosiasi mendekati pH 7.4 maka deprotonasi hanya terjadi sebagian sehingga dapat berperan dalam peningkatan *binding affinity*.

Binding affinity senyawa katekin teh (EGCg, EC, dan EGC) dengan HSA dapat menghambat oksidasi triptofan dan karbonilasi protein yang secara langsung berkaitan dengan diabetes tipe 2 (Özyurt & Estévez, 2016). Metode yang digunakan untuk menghitung *binding affinity* dinilai dari kemampuan fitokimia dalam memadamkan fluoresensi intrinsik triptofan. Data *fluorescence quenching* dihitung untuk konstanta pendinginan bimolekuler (K_q) dan konstanta pengikat (K_b) dari EC, EGC, dan EGCg yang berhubungan dengan HAS. Interaksi antara kedua molekul

biasanya melibatkan reaksi dari gugus hidroksil dengan residu hidroksil dari protein untuk membentuk ikatan hidrogen. Interaksi tersebut dapat mengubah lingkungan mikro dari residu Trp-214 di HSA yang akan berpengaruh pada fluoresensi yang dipancarkan oleh HSA. Hasil penelitian menunjukkan nilai tertinggi dari K_q dan K_b ditemukan pada EGCg.

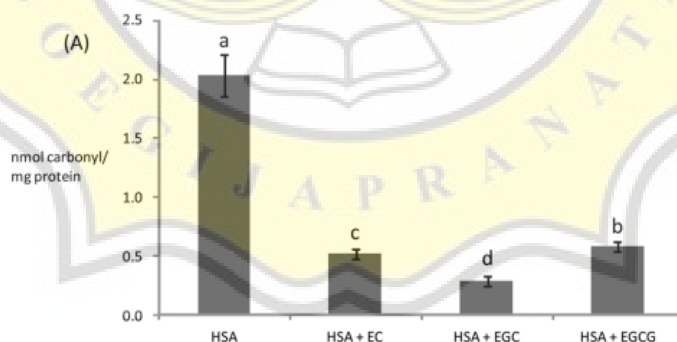
Kemampuan EGCg yang paling tinggi dalam mengikat HSA dikarenakan adanya gugus galoil pada cincin C dari senyawa katekin. Interaksi kedua molekul diukur dengan metode DPPH untuk mengukur aktivitas antioksidan dari katekin teh ketika berinteraksi dengan HSA. Hasil menunjukkan aktivitas *scavenging* (pemusnah) di EGCg dan EC mengalami penurunan yang menghambat kapasitas antioksidan. Kondisi *in vitro* yang menyerupai glikasi dilakukan dengan cara menginkubasi HSA selama 10 hari pada suhu 37°C dengan glukosa (12 mM) dan logam (0.2 mM). Hasil penelitian menunjukkan senyawa triptofan mengalami penurunan sebesar 63% dari jumlah awal sebelum proses inkubasi. Penurunan kadar dari triptofan disebabkan karena sangat sensitif terhadap ROS dan mengalami penipisan sebagai tahap awal kerusakan oksidatif pada protein. Kondisi pra-oksidatif terjadi saat penggabungan glukosa dan logam maka hilangnya kadar triptofan setelah proses inkubasi dapat dipahami karena melalui mekanisme radikal bebas. Selanjutnya, pembentukan stres oksidatif setelah proses inkubasi juga terjadi dengan ditandai terbentuknya karbonil protein seperti α -aminoadipic semi-aldehida (AAS) dan γ -glutamat semi-aldehida. Jika karbonil protein terbentuk dalam kondisi hiperglikemik, kondisi tersebut terjadi pada pasien diabetes. Pada penelitian konsentrasi karbonil pada HSA meningkat dari 0,24 menjadi 2,03.

Pembentukan oksidasi triptofan dan karbonil protein dapat dihambat oleh katekin pada kondisi postprandial dalam HSA yang sudah dimediasi dengan glukosa dan logam. Hasil menunjukkan efektivitas katekin terhadap oksidasi triptofan pada gambar 9.



Gambar 9. Konsentrasi triptofan yang tersisa dalam larutan HSA setelah proses inkubasi dengan katekin EC, EGC, dan EGCg (Özyurt & Estévez, 2016)

Sedangkan untuk perlindungan pada karbonil protein pada gambar 10 (Özyurt & Estévez, 2016). bahwa senyawa katekin yang paling berperan adalah EGC diikuti oleh EC dan EGCg. Persen hambatan senyawa katekin terhadap karbonil protein di HSA sebesar lebih dari 80%. Maka dengan data yang sudah dilampirkan, rutinitas mengkonsumsi teh dapat memberikan efek perlindungan akan pencegahan pada pembentukan karbonil protein dan oksidasi triptofan yang dapat menyebabkan komplikasi lebih lanjut penyakit diabetes tipe II. Selain itu, pengendalian stres oksidatif dengan konsumsi teh dapat berkaitan dengan pencegahan hiperglikemia dalam darah.



Gambar 10. Konsentrasi dari karbonil (AAS + GGS) dalam larutan HSA setelah proses inkubasi dengan katekin EC, EGC, dan EGCg (Özyurt & Estévez, 2016)

4.2 Interaksi Lemak dengan Polifenol

Polifenol dapat mempengaruhi status lipid sehingga berdampak pada enzim yang berperan dalam metabolisme lemak dan asam lemak. Interaksi terjadi antara senyawa polifenol dengan membran sel yaitu fosfolipid bilayer yang akan merubah karakteristik fisikokimianya. Polifenol akan bergabung dengan sisi yang bersifat hidrofilik dari fosfolipid bilayer dan berperan dalam melindungi membran lipid yaitu asam lemak tidak jenuh dari oksidasi. Interaksi akan mempengaruhi sintesis lipid dalam hati termasuk dalam bentuk trigliserida dan asam lemak. Jika sintesis lipid menurun berakibat pada penurunan produksi VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) yang akan berdampak pada kadar trigliserida dalam darah (Kardum & Glibetic, 2018).

Struktur membran sel akan mengalami perubahan jika terdapat senyawa katekin di lapisan ganda lipid. Interaksi antara senyawa polifenol dengan lemak sudah diteliti dengan beberapa metode *in vitro* dan *in vivo*. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Hashimoto *et al.*, (1999) mengembangkan metode sederhana untuk mengukur afinitas antara senyawa polifenol teh dengan lipid bilayer pada liposom. Afinitas polifenol dengan lipid bilayer ditandai dengan jumlah hidroksil pada gugus cincin B, adanya gugus galoil pada senyawa polifenol, dan struktur stereokimia pada senyawa polifenol (Kajiya *et al.*, 2008). Liposom mudah untuk dipisahkan dari medium eksternal dengan metode sentrifugasi karena terdiri dari bahan dalam bentuk fase cair. Senyawa polifenol dari katekin teh digolongkan menjadi dua tipe yaitu *cis*- dan *trans*- dari konfigurasi dua hidrogen pada posisi 2 dan 3 pada cincin C, masing-masing jenis *cis*- dan *trans*-. Contoh senyawa polifenol dari teh yang termasuk ke dalam golongan *cis*- adalah (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECg), dan (-)-epigallocatechin gallate (EGCg). Sedangkan senyawa polifenol yang termasuk dalam golongan *trans*- adalah (+)-catechin (C), (-)-gallocatechin (GC), (-)-catechin gallate (Cg), dan (-)-gallocatechin gallate (GCg).

Afinitas antara senyawa katekin golongan *trans*- dengan lapisan ganda lipid di liposom lebih rendah dibandingkan senyawa katekin golongan *cis*-. Hal yang mempengaruhi tingkat afinitas adalah jumlah gugus hidroksil pada cincin-B dan adanya gugus galoil. Perbedaan jumlah gugus hidroksil pada cincin-B dari gallocatechin antara pada EGC dan EGCg yang memiliki 3 gugus hidroksil akan menurunkan hidrofobisitas dan tingkat afinitas dibandingkan dengan EC dan ECg yang memiliki 2 gugus hidroksil (Hashimoto *et al.*, 1999). Senyawa katekin dengan gugus galoil

efektif mengubah struktur dari membran sel. Maka senyawa katekin dengan adanya gugus galoil seperti ECg, EGCg, Cg, dan GCg memiliki tingkat afinitas paling tinggi dengan lapisan ganda lipid dibandingkan senyawa katekin lainnya (Kajiya *et al.*, 2014).

Gugus galoil dimiliki oleh golongan katekin galat sementara golongan katekin bukan galat tidak memiliki gugus galoil, perbedaan golongan ini menyebabkan perbedaan afinitas yang lebih tinggi pada golongan katekin galat jika berinteraksi dengan lapisan ganda lipid. Gugus galoil pada senyawa katekin merupakan faktor penting untuk menghambat terjadinya sintesis asam lemak (Wang *et al.*, 2003). Sintesis asam lemak merupakan enzim yang berperan penting dalam metabolisme energi secara *in vivo* dan berkaitan dengan beberapa penyakit seperti kanker dan obesitas. Keberadaan sel kanker pada manusia menunjukkan sintase asam lemak dalam tingkat tinggi dan penghambatan sintesis asam lemak secara selektif bersifat sitotoksik terhadap sel kanker (Wang & Tian, 2001).

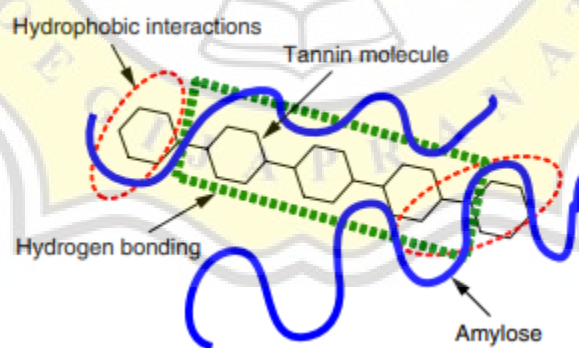
Sebuah penelitian secara *in vitro* melaporkan bahwa senyawa EGCg efektif menghambat sintesis asam lemak dari bahan uji hati ayam. Penghambatan terdiri dari pengikatan cepat reversibel melalui 0,052 mM EGCg yang dapat menghambat sebesar 50% aktivitas sintesis asam lemak dan sebesar 0.10 mM EGCg menghambat 50% aktivitas reaksi reduksi ketoasil dari sintesis asam lemak. Penghambatan dari ketoasil menunjukkan ada pula penghambatan untuk β -ketoasil reduktase dari sintesis asam lemak. Perlindungan dan penghambatan NADPH untuk reduksi ketoasil merepresentasikan bahwa EGCg dapat bersaing dalam sisi ikatan yang sama (Lin, 2006). Selain itu EGCg dominan dengan sisi hidrofobik maka bertanggung jawab untuk menonjol ke dalam lipid bilayer sehingga dapat menghubungi wilayah lipofik bagian dalam sel (Kajiya *et al.*, 2008).

Selain penyakit kanker yang dapat dicegah dengan penghambatan sintesis asam lemak oleh senyawa katekin teh, obesitas juga dapat dicegah melalui senyawa katekin dengan penurunan kadar kolesterol dalam darah. Kadar kolesterol diturunkan dengan cara senyawa katekin akan menghambat Asetil Ko-A yang menyebabkan terhambatnya proses penyerapan kolesterol di dalam usus. Jenis kolesterol yang memberikan efek negatif bagi kesehatan adalah jenis LDL (*Low Density Lipoprotein*), kerap disebut sebagai “kolesterol jahat” karena berperan membawa

kolesterol ke seluruh sel dan jaringan tubuh. Jika jumlah dari LDL menumpuk dan mengendap dalam pembuluh darah akan mengeras menjadi plak (Hardani & Lestariana, 2014).

4.3 Interaksi Karbohidrat dengan Polifenol

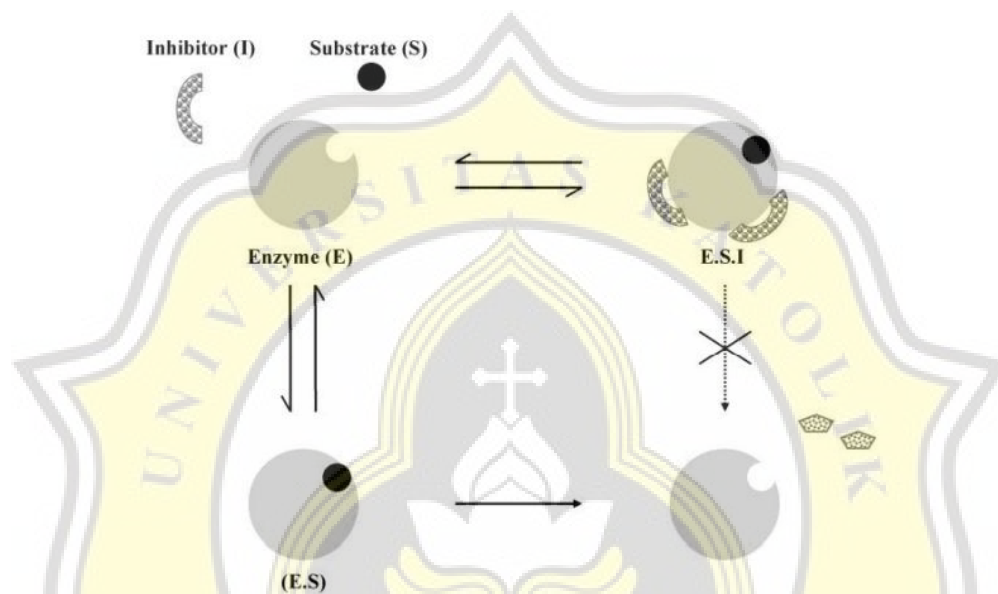
Pada metabolisme karbohidrat, hasil dari pencernaan dan penyerapan glukosa akan meningkat dalam darah setelah proses *postprandial*. Kondisi tersebut harus dihindari oleh seseorang yang mengidap diabetes untuk pencegahan hiperglikemia dalam darah, maka penyakit diabetes melitus berkaitan dengan pencernaan karbohidrat. Peningkatan glukosa dalam darah dapat dicegah dengan penghambatan enzim hidrolisis karbohidrat pada saluran pencernaan yaitu enzim α -amilase dan α -glukosidase untuk mengelola glikemia dalam darah saat *postprandial* (Piparo *et al.*, 2008). Enzim α -amilase merupakan enzim yang diproduksi oleh kelenjar ludah dan pankreas, memiliki fungsi mengubah pati menjadi monomer gula. Sedangkan α -glukosidase merupakan enzim yang diproduksi oleh usus kecil, memiliki fungsi mengkatalisis hidrolisis disakarida (sukrosa dan maltosa) serta oligosakarida menjadi gula sederhana. Pada gambar 11. merupakan ilustrasi dari ikatan karbohidrat dengan polifenol yang berbentuk menyerupai ikatan protein dengan polifenol. Terdiri dari ikatan hidrofobik dan hidrogen yang bergantung pada hidrofilitas dan struktur karbohidrat (Amoako & Awika, 2016).



Gambar 11. Ilustrasi Interaksi Polifenol dengan Karbohidrat (Amoako & Awika, 2016)

Senyawa flavonoid dapat memberikan efek dalam memperlambat penyerapan glukosa dengan menghambat enzim hidrolisis karbohidrat dalam saluran pencernaan (Gonzales *et al.*, 2015). Tahap awal penghambatan enzim oleh senyawa flavonoid adalah dengan pengendapan melalui

pembentukan kompleks inhibitor dengan substrat pada sisi tidak aktif atau membentuk kompleks dengan substrat untuk menurunkan reaktivitas dalam reaksi enzim yang ditunjukkan pada gambar 12. Penghambatan dari enzim hidrolisis akan efektif mengontrol diabetes dan obesitas dengan mengurangi penyerapan glukosa dari pati yang diuraikan oleh enzim hidrolisis (Taylor *et al.*, 2014).



Gambar 12. Penghambatan Enzim dengan Polifenol (Le Bourvellec & Renard, 2012)

Planaritas pada flavonoid, yang disebabkan ikatan tidak jenuh pada C2-C3 akan meningkatkan aktivitas penghambatan enzim α -amilase dan α -glukosidase. Golongan flavonoid yang lebih berpotensi dalam menghambat enzim α -amilase dan α -glukosidase adalah galoil katekin karena dipengaruhi dengan adanya gugus hidroksil pada C3 dan C5 di cincin A-C, serta jumlah gugus hidroksil pada cincin B atau C. Menurut Piparo *et al.*, (2008), penghambatan enzim α -amilase dapat terjadi berdasarkan dua jenis interaksi yaitu terbentuknya ikatan hidrogen oleh gugus hidroksil dari C7 pada cincin A dan C4 pada cincin B dengan rantai samping dari Asp 197 dan Glu 233 serta interaksi π antara Trp 59 dengan cincin heterosiklik dari flavonoid. Peran Asp 197 dan Glu 233 sebagai enzim yang berperan dalam katalisis nukleofilik dan katalisis asam atau basa pada reaksi enzimatis. Selain itu, interaksi polifenol dengan karbohidrat dapat terjadi dalam bentuk interaksi hidrofobik atau disebut interaksi non-kovalen dan ikatan hidrogen yang menyebabkan perubahan

struktur pada karbohidrat, terutama golongan pati (Miao *et al.*, 2014).

Penelitian oleh Taylor *et al.*, (2014) mengenai aktivitas enzim α -amilase yang dipengaruhi oleh ekstrak polifenol teh menunjukkan bahwa hampir seluruh senyawa polifenol pada teh hijau dan teh hitam dapat menjadi inhibitor untuk enzim α -amilase. Nilai konstanta inhibisi (Tabel 12.) dihitung melalui plot Dixon, dengan hasil menunjukkan inhibitor yang kuat terhadap aktivitas α -amilase adalah golongan senyawa katekin galat (ECg > Cg dan EGCg > GCg). Kemudian untuk jenis theaflavin memiliki aktivitas inhibitor lebih kuat dibandingkan katekin karena memiliki jumlah gugus galoil lebih banyak dengan urutan sebagai berikut theaflavin digallate > theaflavin monogallate > theaflavin.

Tabel 12. Konstanta Inhibisi dari Polifenol Teh untuk α -amilase (Taylor *et al.*, 2014)

Sampel	Ki (M)
(-)- <i>Epicatechin gallate</i>	1.4×10^{-4}
(-)- <i>Catechin gallate</i>	3.2×10^{-5}
(-)- <i>Epigallocatechin gallate</i>	2.3×10^{-4}
(-)- <i>Gallocatechin gallate</i>	4.5×10^{-5}
<i>Theaflavin</i>	1.7×10^{-5}
<i>Theaflavin monogallate A</i>	7.8×10^{-7}
<i>Theaflavin monogallate B</i>	1.6×10^{-6}

Pada penelitian secara *in vitro*, (Miao *et al.*, 2014) didapatkan bahwa efek penghambatan oleh katekin terhadap aktivitas α -amilase. Golongan katekin dengan gugus galoil memiliki nilai hambatan 15-40 kali lebih tinggi dibandingkan katekin tanpa gugus galoil. Pada Tabel 13. terlampir nilai IC₅₀, total energi, energi van der Waals, dan energi ikatan hidrogen (Miao *et al.*, 2014). Metode yang digunakan berupa tes alfa amilase untuk memperoleh nilai IC₅₀, merupakan konsentrasi inhibitor yang dibutuhkan untuk menghambat 50% dari laju reaksi awal yang berhubungan pula dengan metode analisis seperti keaslian dan konsentrasi amilase, tipe dan konsentrasi substrat, reaksi pH, temperatur, dan waktu. Sedangkan metode *docking* untuk mencari nilai dari ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals. Nilai IC₅₀ menunjukkan bahwa struktur katekin yang bervariasi berpengaruh pada penghambatan α -amilase, pada katekin dengan gugus galoil memiliki potensi inhibitor yang kuat. Selain itu katekin dengan adanya ikatan *trans*-memiliki aktivitas inhibitor lebih kuat dibandingkan dengan katekin dengan adanya ikatan *cis*-.

Tabel 13. Ringkasan Parameter Penghambatan dan Docking Katekin terhadap α -amilase Manusia (Miao *et al.*, 2014)

<i>Catechins</i>	IC ₅₀ (mM)	<i>Total Energy</i> (kJ/mol)	<i>Van der Waals</i> <i>energy</i> (kJ/mol)	<i>Hydrogen</i> <i>bonds energy</i> (kJ/mol)
(+)- <i>Catechin</i>	45.9	-104.50	-64.24	-40.26
(-)- <i>Epicatechin</i>	40.5	-105.22	-65.02	-40.20
(-)- <i>Epicatechin-3-O-gallate</i>	1.4	-138.45	-89.27	-49.20
(-)- <i>Epigallocatechin</i>	38.2	-104.20	-64.38	-39.82
(-)- <i>Epigallocatechin-3-O-gallate</i>	2.3	-127.74	-84.21	-43.53
(+)- <i>Gallocatechin-3-O-gallate</i>	1.1	-152.23	-96.44	-55.89

Penghambatan enzim α -amilase paling kuat terjadi jika berinteraksi dengan golongan katekin dengan gugus galoil atau kelompok katekin galat seperti GCg, ECg, dan EGCg. Interaksi tersebut mempengaruhi penurunan dari pelepasan dan penyerapan glukosa dalam usus kecil dan berakibat pada penekanan hiperglikemia pada kadar glukosa darah setelah konsumsi.

