

Sintesis dan isolasi theaflavin dari daun teh segar sebagai bahan bioaktif suplemen antioksidan

Synthesis and isolation of theaflavin from fresh tea leaves as bioactive ingredient of antioxidant supplements

Shabri dan Hilman Maulana

*Pusat Penelitian Teh dan Kina, Gambung
Desa Mekarsari, Kecamatan Pasirjambu, Kabupaten Bandung, 40972, Tlp. 022-5928185, Faks : 022-5928186*

Email: anas.shabri@yahoo.co.id

Diajukan: 19 Oktober 2016; direvisi: 4 April 2017; diterima: 30 Agustus 2017

Abstrak

Theaflavin (TF) merupakan komponen hasil oksidasi katekin yang berpengaruh memberikan warna kuning emas, brightness, briskness pada teh hitam dan memiliki aktivitas antioksidan alami yang sangat potensial. TF mempunyai tetapan laju penangkapan radikal superoksida lebih tinggi dari EGCG (Epigallocatechin gallate). Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis komponen TF dalam bentuk ekstrak yang memiliki antioksidan tinggi. Bahan baku berupa daun teh segar petikan p+3 Klon GMB 7 dari Kebun Gambung. Tahapan penelitian adalah pembuatan bubur daun teh 15 liter setiap perlakuan, fermentasi menggunakan fermentor dengan perlakuan laju aliran udara 15 liter/menit, 20 liter/menit, dan 25 liter/menit, pemisahan filtrat dari ampasnya, ekstraksi komponen polifenol dari filtrat menggunakan pelarut etil asetat, pencucian TF dari thearubigin (TR) menggunakan larutan 2,5% NaHCO₃ dalam air, isolasi TF dari senyawa pengotor menggunakan kolom silika gel dengan eluen etil asetat/heksana dan pengujian antioksidan DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hidrazyl). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sintesis TF dari katekin daun teh segar pada laju air udara 25 liter/menit dapat menghasilkan ekstrak berkadar TF 1,01% bk dan setelah melalui isolasi kolom silika gel dengan eluen etil asetat/heksana diperoleh ekstrak TF kemurnian 39,15% bk. Aktivitas antioksidan dalam bentuk penghambatan terhadap radikal

bebas DPPH ekstrak TF menunjukkan nilai EC₅₀ terkecil sebesar 12,16 mg/L pada dosis 150 mg dan aktivitasnya meningkat dengan penambahan konsentrasi dosis ekstrak TF.

Kata kunci: sintesis, isolasi, theaflavin, daun teh segar, aktivitas antioksidan

Abstract

Theaflavin (TF) is a product of catechin oxidation that give contribution to golden yellow color, brightness, briskness of black tea and has a potential as natural antioxidant activity. TF has a higher superoxide radical capture rate than EGCG (Epigallocatechin gallate). The study was to synthesize TF components in the form of extracts that have high antioxidants. Materials used in this research is bud+3 leaves from RITC clone (GMB 7). The research were caried out used 15 liters of tea leaves pulp per treatment, fermentation using fermentor with 15 L/min, 20 L/min and 25 L/min airflow treatment, separation of TF from thearubigin (TR) used 2.5% NaHCO₃, and isolation of TF from impurity compounds used silica gel column with ethyl acetate/hexane as eluent, and DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) for antioxidant activity. The result showed that TF synthesis of fresh tea leaf catechin at water-air rate of 25 liters/minute could produced TF extract and yield TF purity extract with 1.01% and 39.15% in dry weight respectively after isolation by silica gel column. Antioxidant activity by DPPH

from TF extract showed the smallest value of EC50 is 12.16 mg/L at 150 mg dose and its activity increased with the addition of concentration of TF extract.

Keywords: *synthesis, insulation, theaflavin, fresh tea leaves, antioxidant activity*

PENDAHULUAN

Teh telah menjadi minuman terpopuler di dunia setelah air. Kepopulerannya tersebut disebabkan teh mempunyai rasa dan aroma yang atraktif serta menyehatkan (Rohdiana, 2001). Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa teh merupakan bahan pangan yang sangat kaya antioksidan. Tingginya aktivitas antioksidan dalam teh tentunya tidak terlepas dari senyawa polifenol yang dikandungnya (Kokhar and Magnusdottir, 2002).

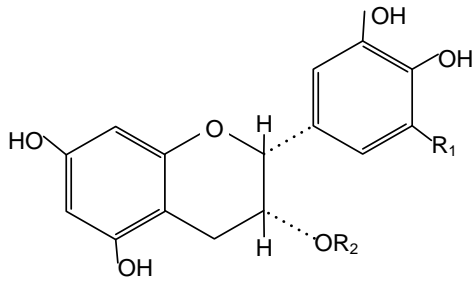
Polifenol pada teh tersedia secara alami yang bertanggung jawab terhadap ketajaman rasa serta aroma yang unik. Kandungan polifenol dalam daun teh bervariasi antara 13-35% berat kering. Sejumlah penelitian menyatakan bahwa polifenol teh yang disebut katekin merupakan senyawa yang paling berperan dalam efek kesehatan yang diterbitkan oleh teh, baik itu teh hitam, teh hijau maupun teh oolong (Rohdiana, 2010; Rohdiana, 2009).

Namun, Katekin bukanlah episode akhir dari popularitas teh sebagai penyedia kesehatan. Theaflavin (TF) yang merupakan hasil fermentasi (oksidasi enzimatis) dari senyawa katekin sudah banyak dipelajari oleh sejumlah peneliti. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dan efek penghambatan sel kanker dari TF setara bahkan tidak sedikit

yang menyatakan bahwa TF lebih potensial daripada katekin (Bedran, et al., 2015; Friedman, et al., 2006; Krishnan, 2004). TF juga dapat mengatasi permasalahan prostat dan liver pada manusia (Henning, 2006; Lee, et al., 2004). Hasil-hasil penelitian mengenai manfaat kesehatan TF berkaitan dengan banyaknya gugus hidroksi (OH). Gugus hidroksi ini dapat berfungsi sebagai antiradikal bebas atau antioksidan, karena semakin banyak gugus hidroksi suatu senyawa, maka kemampuannya sebagai senyawa antioksidan semakin baik (Rohdiana, 2010).

TF bertanggung jawab untuk membentuk warna yang terang (bright colour) dan rasa yang segar (brisk taste) dari air seduhan. Bergantung pada pengolahan teh hitam, TF—pigmen kuning-emas—yang dihasilkan kandungan sekitar 0,4%-1,8% berat kering. Komponen TF tidak tersedia di alam tetapi dihasilkan dari oksidasi dari senyawa katekin. Selama proses oksidasi enzimatis teh, sebagian katekin berubah menjadi TF dan membentuk sebagian besar senyawa TR. Senyawa TF kebanyakan dibentuk sepanjang tahapan maserasi atau penggilingan dalam pengolahan teh hitam. Kelompok senyawa ini menyokong sekitar 30% dari total warna yang merupakan hasil dari proses fermentasi (Pujiyanto et al, 2016; Takino, Y., et al, 1964).

Diketahui bahwa terdapat empat Theaflavin utama seperti theaflavin (TF1), theaflavin-3-gallate (TF2a), theaflavin-3'-gallate (TF2b), dan theaflavin-3-3' digallate (TF3) dengan rumus bangun TF dapat dilihat pada Gambar 1 (Bryce, et al., 1970; Pujiyanto et al, 2016). Struktur TF dibentuk melalui sintesis biokimia dari prekursor katekin yang diinisiasi ketika enzim Polyphenols oxidase (PPO) atau Peroxidase



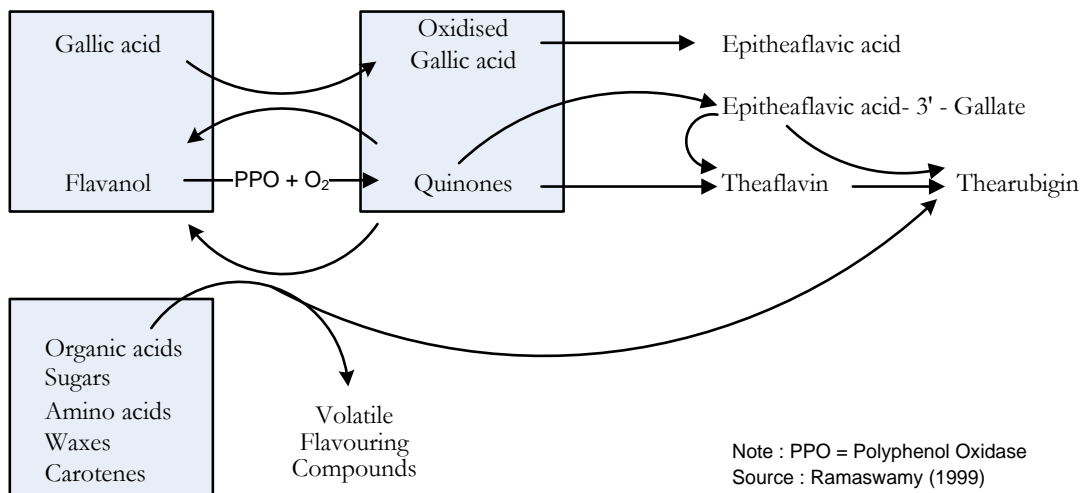
- la. (-)-epicatechin;
R₁=R₂=H
- lb. (-)-epicatechin-3-gallate;
R₁=H, R₂=galloyl
- lc. (-)-epigallocatechin;
R₁=OH, R₂=H
- ld. (-)-epigallocatechin-3-gallate;
R₁=OH, R₂=galloyl

GAMBAR 1.
Struktur senyawa theaflavin

(POD) dengan oksigen mengoksidasi senyawa katekin di dalam quinon (Pujiyanto, et al, 2016; Ramaswamy, 1999; Lewis, et al, 1998; Takino, et al., 1964). Sebagai prekursor TF adalah EC + EGC, TF2a dibentuk dari EC + EGCG, TF2b dibentuk dari ECG + EGC, TF3 dibentuk dari ECG dan EGCG. Mekanisme pembentukan senyawa TF terdapat pada Gambar 2.

TF ini merupakan antioksidan alami yang sangat potensial. Kemampuannya sebagai penangkap radikal bebas sudah tidak dapat dipungkiri lagi kesahihannya.

Efektivitas TF meningkat melalui proses esterifikasi dengan gallate dan ester digallate. Disamping itu, TF mempunyai tetapan laju penangkapan radikal superoksida lebih tinggi dibandingkan dengan dengan EGCG (Epigallocatechin gallate) yang selama ini seakan dianggap sebagai rajanya polifenol teh. Tetapan laju TF adalah 1×10^7 /ms sedangkan tetapan laju EGCG adalah 1×10^5 /ms. TF juga mampu mencegah terjadinya oksidasi lipid atau memotong reaksi berantai oksidasi lipid lebih efektif dari pada EGCG (Rohdiana, 2010).



Note : PPO = Polyphenol Oxidase
Source : Ramaswamy (1999)

GAMBAR 2
Mekanisme pembentukan theaflavin

Teknologi pembuatan TF dari teh telah digunakan dengan cara memberi larutan buffer pada daun teh segar yang sudah dihancurkan dalam sebuah tangki fermentor dengan pemberian oksigen pada konsentrasi tertentu agar proses fermentasi ini mampu menghasilkan TF. Namun demikian, produk TF yang dihasilkan masih dalam bentuk produk dengan tingkat kemurnian rendah akibat masih banyak campuran lainnya baik dari bahan bakunya maupun dari bahan pendukung oksidasinya. Untuk meningkatkan kemurnian, produk yang sudah terbentuk perlu dilakukan proses ekstraksi dan isolasi untuk meningkatkan kemurnian TF di atas.

Penelitian ini bertujuan untuk membuat/membentuk senyawa TF dalam bentuk ekstrak dan memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Manfaat dan dampak dari penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan nilai tambah teh, merangsang tumbuhnya industri hilir teh dalam negeri terutama produk dari komponen kimia teh seperti ekstrak TF, ekstrak katekin, theobromine dan kafein seperti halnya perkembangan konsumsi menambah penganekaragaman produk teh yang dapat meningkatkan konsumsi produk tersebut di Amerika Serikat (Freidman, et al., 2005).

BAHAN DAN METODE

Bahan baku untuk pembuatan TF berasal dari pucuk/daun teh (*Camellia sinensis*) varietas Assamica klon GMB 7. Daun teh dengan petikan p+3 dipetik dari Kebun Percobaan Gambung. Bahan yang digunakan dalam pengujian meliputi Buffer fosfat, Natrium bikarbonat, Etil asetat,

Heksana, serbuk silika gel, Reagen untuk pengujian polifenol, bahan pengujian katekin, bahan pengujian TF. Sedangkan peralatan yang digunakan adalah fermentor kapasitas maksimum 30 liter, penyaring kasa, tabung kolom ekstraksi dan isolasi, evaporator, pengering vakum, instrumen berupa spektrofotometer uv-vis dan High performance liquid chromatography (HPLC).

Pelaksanaan percobaan

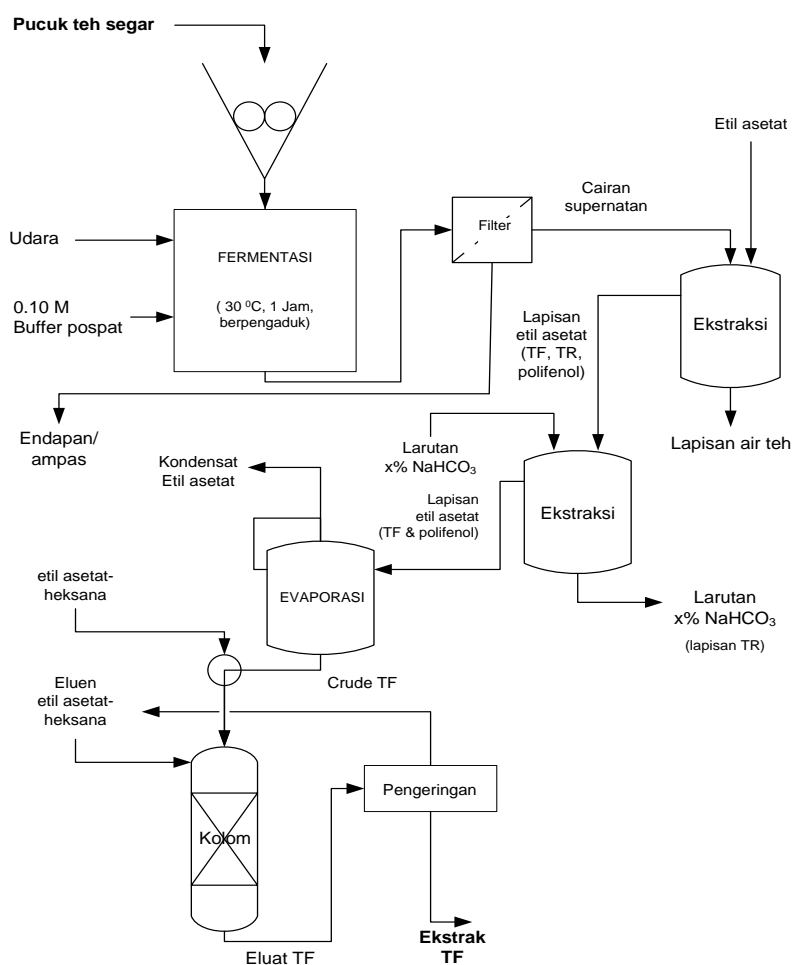
Pembuatan bubur teh dan fermentasi TF dilakukan di Miniplant dan pengujian TF di Laboratorium Pengujian Kimia Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung, pengujian aktivitas antioksidan di Laboratorium Kimia Bahan Alam UNPAD.

Prosedur percobaan adalah pucuk/daun teh dihancurkan menggunakan mesin CTC tea Rolling dan dimasukkan ke dalam fermentor dengan ditambahkan 0,10 M Buffer fosfat dengan perbandingan 1:6 untuk daun segar atau 1:30 berdasarkan berat kering teh pada pH 6-6,5 dengan suhu operasi 30 °C. Udara kemudian dimasukkan ke dalam fermentor dengan volume bubur (slurry) 15 liter/batch. Kecepatan aliran udara untuk proses fermentasi divariasikan dengan 3 tingkat debit udara yaitu: 1) 15 liter/menit; 2) 20 liter/menit; dan 3) 25 liter/menit. Selama proses fermentasi berlangsung campuran diaduk terus menerus selama 1 jam.

Hasil Fermentasi berupa slurry selanjutnya disaring. Selanjutnya, supernatan difiltrasi ulang untuk menghilangkan padatan. Filtrat cair yang dihasilkan kemudian diekstraksi menggunakan pelarut Etil asetat untuk memperoleh komponen polifenol. Lapisan

yang larut Etil asetat selanjutnya diekstraksi dengan larutan Natrium bikarbonat dengan variasi perlakuan 2,5% NaHCO₃ (Hilton, 1973). Proses ini menghasilkan dua lapisan yaitu lapisan Etil asetat merupakan produk TF dan lapisan larutan Natrium bikarbonat merupakan produk TR. Selanjutnya lapisan Etil asetat (kaya TF dan katekin) diisolasi dengan cara dilewatkan kolom dalam kolom silika gel dan dielusi menggunakan etil asetat dan heksan untuk menghasilkan larutan TF. Larutan TF kemudian dipisahkan menggunakan Rotary evaporator sebelum dilakukan pengeringan vakum. Diagram alir fermentasi dan isolasi TF dapat dilihat pada Gambar 3.

Parameter pengamatan adalah kadar TF menggunakan metode Robert dan Smith dalam Hilton 1973, hasil (rendemen, yield) pada setiap tahap proses ISO 9768:1994(E), kadar total katekin menggunakan metode ISO 14502-2:2005 dengan sedikit modifikasi. Parameter uji aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH mengikuti prosedur dalam Yi-fan, et al. (2014); Rohdiana, et al. (2006) dan Cabrera, et al. (2003). Input yang diperlukan adalah tekstur tanah, curah hujan dan evaporasi panci kelas A atau evapotranspirasi potensial yang ditetapkan secara empiris dengan metode Penman (Wijaya, 2008).



GAMBAR 3
Tahapan sintesis dan isolasi TF dari daun teh segar

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bahan baku

Salah satu faktor terpenting yang menentukan kualitas mutu teh adalah bahan baku. Bahan baku yang mempunyai kandungan kimia yang tinggi tentunya lebih baik dipilih untuk penelitian. Namun demikian, pertimbangan lain seperti tingkat ketersediaan menjadi salah satu faktor yang harus mendapat perhatian serius. Klon yang dipilih pada penelitian ini adalah klon seri GMB (GMB 7). Klon seri GMB 7 mempunyai kandungan katekin yang cukup tinggi dengan tingkat produktivitas dan ketersediaan tertinggi yang tersebar di hampir perkebunan teh di Indonesia. Selanjutnya, pada penelitian ini klon GMB 7 dengan petikan p+3 dijadikan bahan baku untuk proses sintesis TF.

Hasil analisis terhadap bahan baku menunjukkan bahwa total katekin klon GMB 7 dengan petikan p+3 ini adalah rata-rata 12,64%. Analisis katekin diperlukan, karena hanya senyawa katekin dari golongan flavanoid ini yang dapat membentuk TF. Kadar katekin ini masih dapat meningkat dengan makin mudanya tingkat petikan seperti pada teh putih Gambung dengan kadar katekin mencapai 18,9% pada jenis petikan imperial peko (hasil analisis teh putih di LP-PPTK).

Theaflavin selama proses fermentasi

TF dalam teh hitam merupakan komponen kimia yang sangat mempengaruhi cita rasa seduhan teh. Kandungan total TF dalam teh hitam secara umum jumlahnya sekitar 0.4-1,8% per berat kering. TF ini berwarna pigmen kuning-

emas bertanggung jawab untuk membentuk warna yang terang (bright colour) dan rasa yang segar (brisk taste) dari air seduhan. Senyawa ini kebanyakan dibentuk sepanjang tahapan maserasi atau penggilingan dalam pengolahan teh hitam. Kelompok senyawa ini menyokong sekitar 30% dari total warna yang merupakan hasil dari proses fermentasi.

Dalam kondisi lingkungan, pembentukan TR dari reaksi oksidasi enzimatis polifenol lebih cepat dibanding dengan TF, sehingga untuk memperoleh ekstrak TR hingga kadar 20%, cukup dengan cara mengekstraksi teh hitam. Sementara itu, reaksi pembentukan TF sangat ditentukan kondisi proses pengolahan yang terkendali seperti bahan baku pucuk, pH, volume udara (oksigen) dan suhu.

Pada penelitian ini, fermentasi dilakukan dalam batch fermentor buatan sendiri. Kondisi fermentasi diatur tanpa adanya penambahan enzim dari luar daun teh, pH diatur sebesar 6,4 dengan buffer fosfat 0,1 M. Penggunaan buffer ini untuk menjaga kestabilan pH karena adanya perubahan komposisi kimia dalam bubur teh selama reaksi.

Suhu diatur pada kisaran 30°C dengan debit udara segar menembus bubur teh divariasikan sebesar 15, 20, 25 liter/menit pada volume 15 liter, lama proses fermentasi 1 jam. Lama tidaknya proses ini sangat menentukan besar kecilnya kandungan TF. Dengan waktu proses yang lebih lama, kandungan TR akan jauh lebih besar dari pada menjadi TF. Karena dengan oksidasi enzimatis maupun kimia, TF akan berubah menjadi TR.

TABEL 1.

Data hasil percobaan sintesis TF dari bubuk teh dalam fermentor

Parameter	Perlakuan I	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1. Debit udara (L/M)	15	20	25
2. Waktu (menit)	60	60	60
3. Umpan pucuk (gram)	2500	2500	2500
- Kadar air (%)	78	77	77
- Berat kering (gram)	550	575	575
4. Volume air (liter)	15	15	15
5. pH slurry (bubur) teh	6,4	6,4	6,4
6. Filtrat teh + buffer (liter)	15	15	15
7. Total solid dalam filtrat (%)	2.23	2.27	2.37
8. Tekanan operasi (atm)	1	1	1
9. Kadar Theaflavin (% bk)	0,88	0,97	1,01

Hembusan debit udara ke fermentor yang semakin meningkat (20 liter/menit dan 25 liter/menit) akan dihasilkan peningkatan kandungan theaflavin menjadi 0,97% dan 1,01%. Peningkatan debit udara dalam proses fermentasi akan meningkatkan reaksi katekin membentuk senyawa baru TF sehingga kadarnya akan bertambah.

Ekstraksi Theaflavin

Isolasi komponen TF dari filtrat hasil fermentasi di atas dilakukan tiga tahap pemurnian yaitu tahap 1 dilakukan ekstraksi dengan pelarut etil asetat untuk melarutkan flavanoid/polifenol dari filtrat teh, tahap kedua dilakukan pencucian lapisan etil asetat dengan larutan 2,5% NaHCO₃ untuk memisahkan komponen TR dari campuran, tahap ketiga dilakukan elusi pada kolom silika gel menggunakan eluen etil asetat/heksana untuk memisahkan senyawa TF dengan senyawa pengotor yang sifatnya mirip dengan TF. Ekstraksi tahap 1 dan

tahap kedua merupakan modifikasi dari metode preparasi analisis TF dan TR oleh Robert and Smith dalam Hilton (1973).

Tabel 2 menunjukkan Hasil analisis terhadap ekstrak kering hasil ekstraksi dan isolasi TF tahap pertama sedangkan Tabel 3 hasil ekstraksi dan isolasi tahap kedua. Hasil analisis isolat TF dari tahap ketiga menunjukkan bahwa ekstrak kering yang dihasilkan mengandung TF sebesar 39,15% bk setelah melalui kolom silika gel dengan eluen etil asetat/heksana. Penggunaan kolom silika gel ini untuk menggantikan matriks kolom sephadex LH-20 yang digunakan oleh DU, et al. (2001) yang harga lebih murah dan ketersediaan mudah.

Tingginya kandungan TF ini dimungkinkan, mengingat proses oksidasi dan isolasi dibuat sedemikian rupa untuk dapat menghasilkan TF semaksimal mungkin. Kandungan TF dalam teh hitam secara umum antara 0.4%-1,8% bk tergantung metode pengolahannya (Anonim, 2003).

TABEL 2

Data hasil percobaan ekstraksi tahap 1 dengan pelarut etil asetat

Parameter	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1. Umpan Filtrat teh (Liter)	15	15	15
2. Umpan larutan etil asetat (liter)	15	15	15
3. Waktu operasi=3xsirkulasi(menit)	60	60	60
4. Hasil Fraksi Etil asetat (liter)	14	14	13.5
5. Potensi <i>yield</i> ekstrak (gram)			
- Fraksi Etil asetat	27,05	27,55	33,73
- Fraksi air	314	279	247
6. Laju alir umpan K-1 (liter/jam)	10	10	10
7. Tekanan operasi (atm)	1	1	1
8. Kadar Theaflavin (% bk)	6,22	12,55	15,06

TABEL 3

Data hasil percobaan ekstraksi tahap 2 fraksi etil asetat dengan larutan natrium bikarbonat

Parameter	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
1. Umpan Fraksi etil asetat (Liter)	10	10	10
2. Larutan NaHCO ₃ (liter)	10	10	10
- Larutan NaHCO ₃ (%)	2,5	2,5	2,5
3. Waktu operasi: 3 x sirkulasi (menit)	60	60	60
4. Hasil Fraksi Etil Esetat -TF-(liter)	9.5	9.5	9.5
5. Potensi <i>yield</i> ekstrak (gram)			
- Fraksi Etil asetat-TF	18	21	23
6. Laju alir Umpan K-II (liter/jam)	10	10	10
7. Tekanan operasi (atm)	1	1	1
8. Hasil Analisa Theaflavin (% bk)	10.25	14.68	19.97

TABEL 4

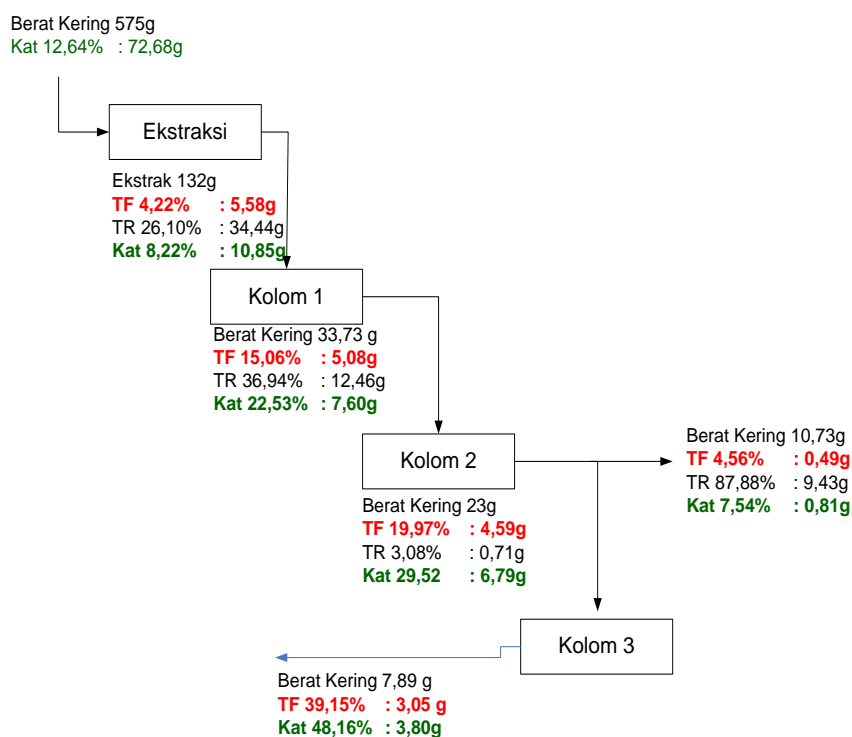
Data hasil percobaan isolasi theaflavin menggunakan kolom silika gel dengan eluan etil asetat/heksana dari sampel perlakuan 3

Parameter	Kolom Silika Gel
1. Umpan Fraksi TF dari konsentrat	
- Fraksi TF dalam gram	46
- Fraksi TF dalam ml	660
2. Volume Eluen etil asetat/heksan (liter)	32
3. Waktu Operasi (jam)	11
4. Silika gel (gram)	800
4. Tekanan operasi (atm)	1
5. Potensi <i>yield</i> (gram)	38,82
- isolat 1-3 (larutan berwarna hijau tua s.d. kuning kehijauan)	16,73
- isolat 4 (isolat kering TF-kuning emas)	12,96
- isolat 5-6 (Larutan warna kecoklatan)	9,13
6. Kadar TF (%bk) hasil Isolasi	
- Isolat 1-3	5,00
- Isolat 4 (isolat TF)	39,15
- isolat 5-6	9,75

Selanjutnya, ekstrak TF yang diperoleh kaya akan TF ini dijadikan bahan bioaktif untuk komposisi utama suplemen antioksidan. Teknologi ini diperoleh hasil samping komponen TR yang tinggi, di mana

senyawa ini juga berpotensi sebagai antioksidan dan efek menyehatkan lainnya. Dengan mengeringkan lapisan natrium bikarbonat dari pemisahan tahap kedua ini diperoleh ekstrak TR.

Kompilasi dari data pada Tabel 1 sampai dengan Tabel 4 ini dapat disusun satu diagram neraca bahan sebagaimana pada Gambar 4.



GAMBAR 4

Neraca bahan pada proses sintesis dan isolasi komponen TF

Untuk mengetahui sejauh mana potensi suplemen kesehatan berbasis komponen TF memberikan manfaat bagi kesehatan tubuh, maka dilakukan analisis kemampuan penghambatannya terhadap radikal bebas DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hidrazyl). Hasil analisis aktivitas antioksidan dalam bentuk kemampuan penghambatan terhadap radikal bebas disajikan pada Tabel 5.

Secara in vitro atau pengujian kimia, TF mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih potensial apabila dibandingkan dengan EGCG. Hal ini disebabkan banyaknya gugus hidroksi (OH) pada TF lebih banyak daripada katekin. Untuk melihat kemampuan aktivitas antioksidan masing-

masing formula dilakukan pengujian aktivitas antioksidannya terhadap DPPH.

TABEL 5

Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH Theaflavin Teh

Dosis ekstrak <i>theaflavin</i> (mg)	Penghambatan (EC 50 (mg/L))
50	89,65
75	39,75
100	26,14
125	17,89
150	12,16

Secara spesifik juga dijelaskan bahwa suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan yang sangat kuat jika nilai EC50 <50 µg/ml, antioksidan kuat jika nilai EC50 antara 50-

100 µg/ml, antioksidan sedang jika nilai EC50 antara 100-150 µg/ml, dan antioksidan lemah jika EC50 antara 151 -200 µg/ml (Rohdiana dan Shabri, 2012).

Hasil analisis pada Tabel 5 menegaskan bahwa pada dosis ekstrak TF 50 mg (terendah) memberikan aktivitas penangkapan radikal bebas yang kuat yakni 89,65 mg/L. Pada dosis 75 mg telah memberikan aktivitas yang sangat kuat yakni 39,75 mg/L. Pada dosis tertinggi 150 mg memberikan aktivitas penangkapan radikal bebas 12,16 mg/L. Semakin tinggi kandungan TF dalam dosis, aktivitas penangkapan radikal bebasnya adalah semakin kuat yang digambarkan semakin kecil angka penghambatan dalam EC50. Hal ini sangat dimungkinkan mengingat senyawa TF adalah dimer katekin yang mempunyai gugus hidroksi (OH) yang lebih banyak dibandingkan dengan katekin yang hanya monomer. Gugus hidroksi ini dapat berfungsi sebagai reduktor, yang akan mereduksi dan menangkap radikal bebas yang terdapat dalam DPPH.

KESIMPULAN

Metode sintesis TF dari pucuk/daun teh segar tanpa penambahan isolat enzim dari luar daun teh dapat menghasilkan ekstrak berkadar TF 1,01% bk. Semakin banyak udara yang dialirkan ke fermentor semakin tinggi kandungan TF dalam ekstraknya. Setelah melalui tiga tahap ekstraksi dan isolasi kolom silika gel dengan eluen etil asetat/heksan diperoleh ekstrak TF kemurnian 39,15% bk.

Aktivitas antioksidan dalam bentuk penghambatan terhadap radikal bebas DPPH (1,1-diphenil-2-picryl hidrazyl) ekstrak TF

menunjukkan nilai EC50 terkecil sebesar 12,16 mg/L pada dosis 150 mg dan meningkat penghambatannya dengan penambahan konsentrasi (dosis) ekstrak TF.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini kami mengucapkan banyak terima kasih kepada Kepala Pusat Penelitian Pengembangan Perkebunan beserta jajarannya yang telah mengalokasikan anggarannya untuk penelitian ini, Dr. Joko Santoso selaku Direktur Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK) saat penelitian, Dr. Luqman Erningpraja selaku *Caretaker* Direktur PPTK saat ini, para pejabat PPTK beserta jajarannya, Teknisi Kelompok Penelitian Pascapanen dan semua pihak yang telah membantu dan berkontribusi dalam tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. (2003). Biochemical index of tea colour. Retrieved 5 2005, 7, from Tocklai: <http://www.tocklai.org>
- Bedran, T. B. L., M. P. Morin, D. P. Spolidorio, D. Grenier. 2015. Black tea extract and its theaflavin derivatives inhibit the growth of periodontopathogens and modulate interleukin-8 and β -defensin secretion in oral epithelial cells. *PLoS ONE* 10(11): DOI:10.1371/ Journal.pone.0143158.
- Bryce, T., Collier, P.D Fowles, L., Thomas, P.E., Frost D., and Wilkins, C.K. 1970. The structures of the theaflavins of

- black tea. *Tetrahedron Lett*, 11, p. 2789-2792.
- Cabrera, G.; Gimenez, R.; Lopez, M.C. 2003. Determination of tea component with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 51. p. 4427-4435
- Chen, R.L.C.; Lin, C.H.; Chung, C.Y.; Cheng, T.J. 2005. Determination of tannin in green tea infusion by flow-injection analysis based on quenching the fluorescence of 3-aminophthalate. *J. Agric. Food Chem.* 53. p. 8443-8446
- Daykin, C.A.; Van Duynhoven, J.P.M.; Gronewegen, A.; Dachtler, M.; Van Amelsvoort, J.M.M.; Mulder, T.P.J. 2005. Nuclear magnetic resonance spectroscopic based studies of the metabolism of black tea polyphenols in humans. *J. Agric. Food Chem.* 53. p. 1428-1434
- Dorstern, F. A.V., Daykin, C.A., Mulder, T.P., and Duynhoven. 2006, Metabolismic approach to determine metabolic differences between green tea and black tea consumption. *J. Agric. Food Chem.* 54. p. 6929-6938
- Du QZ, Jiang HY, Ito Y. 2001. Separation of theaflavins of black tea. High-speed countercurrent chromatography vs. Sephadex LH-20 (gel column) chromatography. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol*, 24(15), p. 2363–2369
- Friedman, M., P. R. Henika, C. E. Levin, R. E. Mandrell, and N. Kozukue. 2006. Antimicrobial activities of tea catechin and theaflavin and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*. Vol. 69 (2). p 354 – 361.
- Freidman, M.; Kim, S.Y.; Lee, S.J.; Han, G.P.; Han, J.S. Lee, K.R.; Kozukue, N. 2005. Distribution of catechin, theaflavin, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in The United States. *J. Food Chem. and Toxicol.* 70(9). p. C550-C559
- Henning, S.M., Aronson, W., Niu, Y., Conde, F., Lee, N.H., Seenam, N.P., Lee, R.P. Harris, D.M., Moro, A., Hong, J., Pat-Shan, L., Barnard, R.J., Ziaee, H.G., Csathgo, G., Go, V.L. and Wang. H. 2006. Tea polyphenols and theaflavin are present in prostate tissue human and mice after green and black tea consumption. *J. Nutrition* 136 (7), p. 1839-1843
- Hilton, P. J. 1973. Tea: *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*. (18), p. 455-518
- International Standard of Organisation. 1994. Tea-Determination of water extract. ISO 9768:1994(E). Switzerland: ISO
- International Standard of Organisation. 2005. Content of catechin in green tea – Method using High Performance Liquid Chromatography. ISO 14502-2:2005(E). Switzerland: ISO
- Khoar, S. and Magnusdottir S.G.M. 2002. Total phenols, catechin and caffeine content of tea commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem*, 50. p. 565-570
- Krishnan, R., and Maru, G.B. 2004. Inhibitory effect (s) of polymeric black tea polyphenols fractions on the formation of [3H]-B(a)-derived DNA adduct. *J. Agric. Food Chem.* 52. p. 4261-4269
- Li, W., and TU, Y. 2014. Tea Polyphenols Affect Cancer Cells on MAPK Pathways. *Proceedings of The International Tea Symposium 2014*.

- November 10-13, 2014. China: Hangzhou.
- Lee, H.H.; Ho, C.T.; and Lin, J.K. 2004. Theaflavin-3,30-digallate and penta-O-galloyl-b-D-glucose inhibit rat liver microsomal 5a-reductase activity and the expression of androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *References. Carcinogenesis* 25 (7). p. 1109-1118
- Menent, M.R., Sang, S., Yang, C.S., Ho, C.T., and Roser, R.T. 2004. Analysis of Theaflavins and Thearubigins from black tea extract by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 52. p. 2455-2461
- Pujiyanto, Prawira-Atmaja, M. I., and Rohdiana, D. 2016. Theaflavin, natural pigment on black tea and its pharmacological activities. 3rd Natural Pigment Conference for South East Asia. 22-23 August 2016, Malang-Indonesia.
- Rohdiana, D. 2010. Active ingredients dan Arah Industri Hilir Teh. *Food Review Indonesia*. Vol 5(2) Februari 2010.
- Rohdiana, D. 2009, Teh Ini Menyehatkan, Telaah Ilmiah Populer, Cetakan Pertama. Penerbit Alfabeta, Bandung.
- Rohdiana, D., Cahyadi, W. dan Tresnawati, T. 2005a. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picryldizrazyl) Beberapa Minuman Teh. *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Industri-UNS Surakarta*, 6 September 2005.
- Rohdiana, D., Achyadi, N.S. dan Gustalya, L. 2006. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picryldizrazyl) Oleh Produk Teh Celup Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Persatuan Ahli Teknologi Pangan Indonesia-UGM Yogyakarta* 2-4 Agustus 2006.
- Rohdiana D., and Shabri. 2012. Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) beberapa minuman teh dalam kemasan. *Jurnal Teh dan Kina* 15(2). p. 89-93
- Ramaswamy, S. 1999. *Manufacture of Black and Green Tea in India, Sri Lanka and Africa*. *Global Advances in Tea Science*, p. 745-760.
- Sava, M.V., Yang, S.M., Hong, M.Y., Yang, P.C., and Huang, G.S. 2001. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. *Food Chemistry* 73. p. 177-184
- Takino, Y., Imagawa, H., Horikawa, H., and Tanaka, A. 1964. Studies on the mechanism of the oxidation of tea leaf catechins Part III: formation of a reddish orange pigment and its spectral relationship to some benzotropolone derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, 28. p. 64-71.
- Yang, C. S and J. Hong. 2014. Prevention of Chronic Diseases by Tea: Possible Mechanisms and Human Relevance. *Proceedings of The International Tea Symposium 2014*. November 10-13, 2014. China: Hangzhou.
- Yi-fan F., and G. Jia-shun. 2014. Study on in vitro Antioxidant Activity of Water Extract and Anthocyanin from Zi-Juan Sun-dried Green Tea. *Proceedings of The International Tea Symposium 2014*. November 10-13, 2014. China: Hangzhou.