

**STUDI *IN SILICO* POLA INTERAKSI ANTARA POLIFENOL
EGCG TEH dengan PROTEIN *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT)
dan *Lipoxygenase* (LOX)**

SKRIPSI

oleh

NURUS SYAMSIYAH

155090101111045



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

**STUDI *IN SILICO* POLA INTERAKSI ANTARA POLIFENOL
EGCG TEH dengan PROTEIN *Kunitz Inhibitor Trypsin (KIT)*
dan *Lipoxygenase (LOX)***

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
dalam Bidang Biologi**

oleh
NURUS SYAMSIYAH
155090101111045



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI *IN SILICO* POLA INTERAKSI ANTARA POLIFENOL
EGCG TEH dengan PROTEIN *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT)
dan *Lipoxygenase* (LOX)**

NURUS SYAMSIYAH
155090101111045

Telah dipertahankan di depan Majelis Penguji pada 6 Desember 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam Bidang Biologi

Menyetujui
Pembimbing

Dr. Sri Widyarti, M.Si.
NIP. 196705251991032001

Mengetahui
Ketua Program Studi S1 Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dian Siswanto, S.Si., M.Sc., M.Si., Ph.D
NIP. 197703202005011002

HALAMAN PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nurus Syamsiyah

NIM : 155090101111045

Jurusan : Biologi

Penulis skripsi berjudul : **STUDI *IN SILICO* POLA INTERAKSI
ANTARA POLIFENOL EGCG TEH dengan PROTEIN *Kunitz*
Inhibitor Trypsin (KIT) dan *Lipoxygenase (LOX)***

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini semata-mata digunakan sebagai acuan atau referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung segala resiko.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 06 Desember 2019

Yang menyatakan,

Nurus Syamsiyah

155090101111045

PEDOMAN PENULISAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

STUDI *IN SILICO* POLA INTERAKSI ANTARA POLIFENOL EGCG TEH dengan PROTEIN Kunitz Inhibitor Trypsin (KIT) dan Lipoxygenase (LOX)

Nurus Syamsiyah, Sri Widyarti

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Brawijaya

2019

ABSTRAK

Diversifikasi pengolahan tempe menjadi susu tempe diperlukan untuk memperkaya olahan tempe. Namun masalah utama terhadap konsumsi produk kedelai yaitu adanya faktor *antinutritional* yang disebabkan oleh protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) dan adanya rasa atau sensasi *astrigency* yang tidak menyenangkan dari protein *Lipoxygenase* (LOX). Penambahan larutan teh yang memiliki senyawa polifenol EGCG (Epigallocatechin gallat) diperlukan untuk meminimalisir faktor-faktor tersebut. Tujuan penelitian ini yaitu untuk memprediksi interaksi, perubahan struktur, jenis ikatan, dan *energy binding* antara struktur 3D senyawa EGCG dengan protein model KIT dan LOX melalui analisis *docking in silico*. Protein model didapatkan dari *database Protein Data Bank* (PDB) dengan kode protein KIT (PDB:1BA7) dan protein LOX (PDB:IF8N). Struktur 3D EGCG diperoleh dari *database PubChem* (PubChem CID: 65064). Setelah itu dilakukan *docking* antara ligan EGCG dan setiap protein menggunakan *software Hex. Super Impose* dilakukan dengan aplikasi *online SuperPose Version 1.0*. Hasil simulasi *docking in silico* menunjukkan adanya tiga jenis ikatan meliputi ikatan hidrogen, elektrostatik dan hidrofobik pada residu asam amino Thr34, Asn36, Arg160, Ile152, dan Glu101 pada protein KIT dan Asn370, Ile412, Asp408, Asp411, dan Ile412 pada protein LOX. Nilai *Binding Energy* antara kompleks KIT-EGCG sebesar -238,77 dan LOX-EGCG yaitu -309,86. Penambahan senyawa EGCG terhadap protein KIT dan LOX pada kedelai kurang optimal karena LIG1 tidak berikatan pada *active site* dan ikatan disulfida dari protein KIT atau *active site* dari LOX. Diperkirakan akan terjadi endapan dalam larutan susu tempe melalui interaksi *multisite* dan ikatan lemah yang terjadi dapat memiliki kemampuan kembali pada kondisi semula (*reversible*). *Super Impose* menunjukkan tidak ada perubahan pada protein yang telah *didocking*.

Kata kunci : *Docking*, EGCG, ikatan lemah, protein tempe (KIT dan LOX)

IN SILICO STUDIES of INTERACTION PATTERN BETWEEN TEA EGCG POLYPHENOL with PROTEINS *Kunitz Inhibitor Trypsin (KIT) and Lipoxygenase (LOX)*

Nurus Syamsiyah, Sri Widarti

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

Brawijaya University

2019

ABSTRACT

Diversification processing of tempe into tempe milk is very important to enrich the tempe refined products, but the main problem towards consumption soy products is the presence of antrnutritional factors caused by the Kunitz Inhibitor Trypsin (KIT) protein and the bad taste or astrigency sensation of the Lipoxygenase (LOX) protein. The addition of tea solution that an EGCG (Epigallocatechin gallat) polyphenol compounds is needed to minimize those factors. The purpose of this research is to predict interactions, structural changes, types of bonds, and energy binding between the 3D structure of EGCG compounds with protein models KIT and LOX through docking in silico analysis. Protein models are obtained from the PDB (Protein Data Bank) database with codes KIT protein (PDB:1BA7) and LOX protein (PDB:IF8N). The 3D structure of EGCG was obtained from the PubChem database (PubChem CID: 65064). After that, docking between EGCG ligand and each proteins was carried out using Hex software. Super Impose is done with the SuperPose Version 1.0 online application. The docking in silico simulation results show that there are three types of bonds including hydrogen bonds, electrostatic and hydrophobic bonds on amino acid residues of Thr34, Asn36, Arg160, Ile152, and Glu101 on the KIT protein and Asn370, Ile412, Asp408, Asp411, and Ile412 on LOX protein. The Binding Energy value between KIT-EGCG complex is -238.77 and LOX-EGCG is -309.86. The addition of EGCG compounds to protein KIT and LOX in soybeans was less than optimal because LIG1 did not bind to the active site and disulfide bonds of the KIT protein or the active site of LOX. It is estimated that sediment will occur in a solution of tempe milk through multisite interactions and weak bonds that occur can have the ability to return to its original condition (reversible). Super Impose shows that there is no change in the protein that has been docked.

Keyword : Docking, EGCG, tempe protein (KIT and LOX), weak bonds.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil ‘Alamiin, Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayahNya, sehingga skripsi yang berjudul ” **STUDI IN SILICO POLA INTERAKSI ANTARA POLIFENOL EGCG TEH dengan PROTEIN *Kunitz Inhibitor Trypsin (KIT)* dan *Lipoxygenase (LOX)***” ini dapat diselesaikan dengan lancar.

Laporan skripsi ini dapat diselesaikan berkat bantuan dari berbagai pihak, sehingga disampaikan banyak terima kasih kepada berbagai pihak yang telah membantu mulai penelitian hingga penulisan laporan, antara lain kepada :

1. Ibu Dr. Sri Widyarti, M.Si selaku pembimbing yang telah membimbing dan memberikan motivasi, saran serta ilmu mulai awal penelitian hingga terbentuknya skripsi ini.
2. Prof. Sutiman B.S., SU.,D.Sc dan Drs. Sofy Permana, MSc.,D.Sc sebagai Dosen Penguji di Seminar Proposal, Seminar Hasil Penelitian dan Ujian Skripsi yang telah memberikan saran, ilmu serta motivasi.
3. Aba Syamsuddin (Alm) dan Ummi’ Nurhayati selaku orang tua yang sangat saya cintai, Imamatzahroh S.Tr.Keb, Faridatul Afifah, Zain Farhani dan Mohammad Afthan el Ibad yang senantiasa memberi semangat dan doa, sehingga semuanya berjalan lancar.
4. H. Masudi, H. Zainal Bakri (Alm), Sumaria, Selket (Alm), dan Muahmin selaku Kakek Nenek serta seluruh keluarga.
5. Seluruh sahabat, teman-teman Biologi angkatan 2015 serta semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 06 Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMBANG dan SINGKATAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kedelai (<i>Glycine max</i> (L) Merr.)	4
2.2 Tempe	5
2.3 Protein <i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT)	7
2.4 Protein <i>Lipoxygenase</i> (LOX)	10
2.5 Teh (<i>Camelia sinensis</i>)	11
2.6 Mekanisme Koagulasi Protein	14
2.7 <i>Docking</i> Molekuler <i>In silico</i>	16
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.2 Kerangka Operasional	19
3.3 Pengambilan Data	20
3.4 Optimalisasi Protein dan Ligan	22
3.5 <i>Docking In Silico</i> Protein Tempe dengan Ligan EGCG	22
3.6 <i>Super Impose</i> antara Protein dan Kompleks Hasil <i>Docking</i>	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Visualisasi Protein <i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT)	24
4.2 Visualisasi Protein <i>Lipoxygenase</i> (LOX)	28

4.3 Visualisasi Senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG)	30
4.4 Analisis Interaksi Protein KIT dengan Senyawa EGCG	31
4.5 Analisis Interaksi Protein LOX dengan Senyawa EGCG	36
4.6 <i>Binding Energy</i> Interaksi Protein KIT dan LOX dengan Senyawa EGCG	46
4.7 Hasil Visualisasi <i>Super Impose</i> Kompleks KIT-(KIT-EGCG)	46
4.8 Hasil Visualisasi <i>Super Impose</i> Kompleks LOX-(LOX-EGCG)	48

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	49
5.2 Saran	49

DAFTAR PUSTAKA

50

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Struktur Katekin EGCG (PDB)	14
2	Protein <i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT)	21
3	Protein <i>Lipoxygenase</i> (LOX).....	21
4	Senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG).....	21
5	Struktur 3D Protein <i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT).....	27
6	Struktur Primer dari Protein KIT Kedelai	27
7	Struktur 3D Protein <i>Lipoxygenase</i> (LOX)	30
8	Struktur 3D Senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG)	31
9	Interaksi Struktur 3D antara Protein KIT dengan Senyawa EGCG	35
10	Struktur 3D <i>Ligand Interaction</i> Protein KIT dengan Senyawa EGCG	36
11	Interaksi Struktur 3D antara Protein LOX dengan EGCG	39
12	Struktur 3D <i>Ligand Interaction</i> Protein LOX dengan Senyawa EGCG.....	40
13	<i>Super Impose</i> Protein KIT dengan Kompleks KIT-EGCG	47
14	<i>MolScript Superposition Image</i> Protein KIT dengan Kompleks KIT-EGCG	47
15	<i>Super Impose</i> Protein LOX dengan Kompleks LOX-EGCG	48
16	<i>MolScript Superposition Image</i> Protein LOX dengan Kompleks LOX-EGCG	48

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Jenis protein antinutrisional dalam kedelai	11
2	Interaksi antara protein <i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT) dengan senyawa EGCG	42
3	Interaksi antara protein <i>Lipoxygenase</i> (LOX) dengan senyawa EGCG	44

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol/singkatan

Ala

Arg

Asn

Asp

BBI

Cys

EGCG

Gln

Glu

His

Ile

KIT

Leu

LOX

Lys

Met

PDB

Phe

Ser

Thr

Trp

Tyr

Val

Keterangan

Alanine

Arginine

Asparagine

Aspartate

Bowman-Birk Inhibitor

Cysteine

Epigallocatechin gallate

Glutamine

Glutamate

Histidine

Isoleucine

Kunitz inhibitor trypsin

Leucine

Lipoxygenase

Lysine

Methionine

Protein Data Bank

Phenylalanine

Serine

Threonine

Tryptophan

Tyrosine

Valine

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tempe adalah makanan fermentasi oleh jamur yang berasal dari Indonesia dan sebagian besar terbuat dari kacang kedelai (*Glycine max* (L) Merr.) melalui fermentasi dengan *Rhizopus* sp. (Roubos-van den Hil dkk., 2010). Bahan baku tempe yaitu kedelai yang merupakan sumber protein berkualitas tinggi, rendah lemak jenuh dan bebas kolesterol (Yang dkk., 2018). Produk kedelai banyak digunakan untuk meningkatkan asupan protein, dan mengurangi asupan karbohidrat (Murray dkk., 2012). Mengonsumsi kedelai utuh lebih efektif dari pada komponen kedelai saja seperti suplemen kedelai (Nourieh dkk., 2012; Eslami & Shidfar., 2019). Dibandingkan dengan produk kedelai lain yang tanpa fermentasi, tempe memiliki keunggulan lebih yaitu kualitas nutrisinya lebih fungsional karena peran dari mikroorganisme (Yang dkk., 2018) dalam peningkatan nutrisi dan zat bioaktifnya (Oyedeji dkk., 2018). Diversifikasi pengolahan tempe menjadi susu tempe sangat diperlukan untuk lebih memperkaya olahan tempe. Susu tempe dapat dimanfaatkan sebagai minuman yang bermanfaat dalam kesehatan (Abdullah & Asriati dkk., 2016 ; Tang dkk., 2019).

Meskipun banyak nutrisi yang menguntungkan dari kedelai namun ada juga faktor *antinutrients* seperti protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) yang dapat menghambat enzim tripsin dalam proses pencernaan makanan (Desphande, 2002) dan protein *Lipoxygenase* (LOX) yang menyebabkan aroma kurang menyenangkan (*astrigency*) sehingga menjadi masalah ketika produk kedelai dikonsumsi (Oyedeji dkk., 2018; Vagadia dkk., 2017; Liliana dkk., 2019). *Antinutrients* adalah senyawa yang dapat mengurangi pemanfaatan nutrisi atau asupan makanan yang digunakan sebagai pangan manusia (Gemede & Ratta dkk., 2014). Keterlibatan protein *antinutritional* dalam menentukan kualitas produk kedelai membuatnya menjadi hal yang menarik untuk diteliti. Inaktivasi protein KIT dan LOX akan meningkatkan kualitas protein dan daya cerna dari produk kedelai sehingga sangat dipertimbangkan dalam pengolahannya (Vagadia dkk., 2017). Penambahan teh dapat diharapkan menjadi salah satu solusi untuk mengurangi adanya faktor *antinutritional* dan meminimalisir aktivitas protein tersebut. Menurut Hasni dkk., (2011)

senyawa polifenol saat ini dipandang penting karena dapat mengurangi aktivitas protein yang ada didalam kedelai dengan adanya senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG).

Penelitian Vanga dkk., (2018) menunjukkan bahwa molekul protein KIT distabilkan dengan dua katan disulfida. Ketika ikatan disulfida lepas maka terjadi inaktivasi protein KIT. Selain itu modifikasi pada sisi aktif protein KIT dan LOX akan menghilangkan aktivitas. Oleh karena itu perlu dikaji upaya mengurangi potensi protein *antinutritional* yang ada pada produk kedelai dengan menambahkan teh. Efek penghambatan polifenol alami EGCG pada protein KIT dan LOX ini belum banyak dibahas, sehingga penelitian ini penting untuk dilakukan. Namun senyawa polifenol menunjukkan interaksi yang kuat dengan protein sehingga membentuk kompleks dan dapat menyebabkan protein *unfolding* atau pengendapan (Hasni dkk., 2011). Fenomena pengendapan pada produk makanan tidak semuanya kurang baik, karena masih bisa dikonsumsi untuk diambil manfaatnya. Polifenol diketahui membentuk kompleks dengan protein yang akan menyebabkan perubahan pada sifat struktural dari kedua senyawa. Mekanisme koagulasi protein terjadi ketika struktur protein berangsur-angsur terbuka, beberapa kelompok hidrofobik yang awalnya tertanam didalam molekul menjadi terbuka. Protein yang tidak terlipat cenderung berinteraksi satu sama lain melalui interaksi antarmolekul hidrofobik dan akan mengarah pada agregasi protein (Tang dkk., 2019). Penelitian Al-Hanish dkk., (2016) menunjukkan bahwa senyawa EGCG menginduksi perubahan pada struktur protein susu sapi, hal tersebut yang menjadikan dasar peneliti ingin memprediksi lebih lanjut *inaktivasi* protein *antinutritional* oleh senyawa EGCG dengan melihat ikatan yang ada pada *active site*, dan *disulfide bridge* protein ketika susu tempe dicampur dengan polifenol teh. Salah satu metode untuk memprediksi pola interaksi antara protein dan ligan yaitu dengan *docking* molekuler *in silico*. Metode bioinformatika ini dapat mengetahui ikatan-ikatan yang ada (Aiello dkk., 2018) dan mengkaji konformasi molekul serta perubahannya (Fatchiyah, 2015). *In Silico* memiliki banyak jenis analisa dengan beberapa *software*. *Docking* merupakan suatu metode *in silico* untuk mengkomplekskan antara ligan dan target (reseptor) dalam pendekatan komputasi untuk menganalisis kompleks struktural dan spesifisitas target (Syed & Nighat., 2015).

Selain itu metode *Super Impose* juga digunakan untuk mengetahui adakah perubahan pada protein KIT dan LOX setelah *didocking*. Aplikasi *WebServer Super Impose* dapat membandingkan dua molekul dan menentukan apakah bagian tertentu dari molekul itu hadir atau tidak dalam molekul lain (Bauer dkk., 2008).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini yaitu Bagaimanakah interaksi, perubahan struktur, jenis ikatan, dan *energy binding* antara struktur 3D senyawa EGCG (Epigallocatechin gallat) dengan protein model *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) dan *Lipoxygenase* (LOX) melalui analisis *docking in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilaksanakannya penelitian ini yaitu Untuk memprediksi interaksi, perubahan struktur, jenis ikatan, dan *energy binding* antara struktur 3D senyawa EGCG (Epigallocatechin gallat) dengan protein model *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) dan *Lipoxygenase* (LOX) melalui analisis *docking in silico*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang prediksi interaksi ikatan antara protein *antinutritional* pada tempe dengan senyawa polifenol pada teh sebagai potensi pengurangan faktor *antinutritional* dalam makanan berbasis kedelai. Sehingga bisa dapat dijadikan landasan untuk pengembangan minuman herbal fungsional berbahan dasar tempe.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kedelai (*Glycine max* (L) Merr.)

Tanaman Leguminosae meliputi kacang-kacangan seperti kedelai, buncis, kacang polong dan kacang tanah adalah sumber protein nabati yang penting di dunia (Guixer dkk., 2017). Kedelai merupakan salah satu sumber makanan populer bagi konsumen yang sadar akan kesehatan (Lee dkk., 2017) karena kedelai memiliki banyak manfaat (Preece dkk., 2017). Kedelai dan turunannya telah terbukti sebagai bahan serbaguna karena nutrisi, sifat fungsionalnya dalam kesehatan, dan harga yang relatif murah (Jideani, 2011). Nutrisi merupakan makanan yang dimasukkan kedalam tubuh, dapat diuraikan, dan diserap dengan baik (Campbell dkk., 2010). Kedelai banyak dikonsumsi karena tinggi protein dan asam aminonya relatif seimbang. Kedelai juga banyak dimanfaatkan oleh industri pengolahan makanan dan pakan ternak (Oyedeji dkk., 2018). Namun kedelai menjadi salah satu polong-polongan yang memiliki jumlah *inhibitor protease* tertinggi, sekitar 2% dari bungkil kedelai atau 2-6% dari protein kedelai (Vagadia dkk., 2017).

Biji kedelai mengandung lebih dari 35-40 % protein (Preece dkk., 2017). Protein adalah salah satu nutrisi utama yang ada dalam makanan dan berperan utama dalam respon imun, pembentukan dan pemeliharaan otot. Protein juga dapat bertindak sebagai sumber energi vital bagi tubuh manusia selain karbohidrat karena menyediakan 4 kkal per gram protein. Protein juga bertanggung jawab untuk beragam fungsi biologis (Vanga dkk., 2018). Protein kedelai merupakan salah satu protein makanan yang semakin penting dalam diet manusia. Protein kedelai merupakan sejenis struktur bahan yang sangat baik untuk menjadi berbagai sistem pengiriman berstruktur nano bahan bioaktif makanan (Tang dkk., 2019). Biji kedelai telah dikonsumsi di Asia dan di bagian dunia lainnya dalam bentuk segar, kering dan fermentasi. Produk makanan berbasis kedelai cukup banyak, meliputi tahu, tempe, susu kedelai, kecap, miso, dan yang lainnya (Alghamdi dkk., 2018). Fermentasi makanan berbasis kedelai banyak digunakan untuk meningkatkan zat bioaktifnya dan mengurangi *antinutrients* (Oyedeji dkk., 2018).

Konsumsi kedelai yang tinggi juga telah dikaitkan dengan pengurangan insidensi penyakit jantung karena merupakan sumber protein berkualitas tinggi, rendah lemak jenuh, dan bebas kolesterol (Lee., 2017). Protein kedelai dapat meningkatkan asupan total protein dan mengurangi asupan karbohidrat atau lemak. Selain dapat menurunkan kolesterol, protein kedelai menunjukkan efek anti kanker, obesitas, diabetes dan penyakit ginjal (Tang dkk., 2019). Namun, diet berbasis kedelai dapat menimbulkan beberapa kerugian karena keberadaan komponen tertentu yang dikenal sebagai faktor *antinutrients* (Haidar dkk., 2018). Faktor *antinutrients* yang ada dalam kedelai menjadi masalah utama dalam konsumsi kedelai (Oyedeji dkk., 2018). *Antinutriens* adalah senyawa yang dapat mengurangi pemanfaatan nutrisi atau asupan makanan yang digunakan sebagai pangan manusia (Gemedé & Ratta dkk., 2014). Salah satu molekul *antinutrients* pada kedelai yaitu protein *Kunitz Inhibitor Trpsin* (KIT) dan *Lipoxygenase* (LOX) (Liliana dkk., 2019). Adanya faktor *antinutrients* tersebut pada saat dikonsumsi dapat dihilangkan secara memadai atau diminimalisasi oleh pemrosesan yang tepat (Oyedeji dkk., 2018). Namun beberapa *antinutrients* dapat memberikan efek menguntungkan dalam kesehatan pada konsentrasi rendah. Efek menguntungkan dan merugikan dari senyawa bioaktif *antinutrients* tanaman bergantung pada konsentrasi, struktur kimia, waktu pemaparan dan interaksi dengan komponen lainnya (Gemedé & Ratta dkk., 2014).

2.2 Tempe

Salah satu olahan kedelai yang sangat populer dan sudah menjadi makanan pokok di Indonesia adalah tempe. Produk tempe sangat banyak dimanfaatkan terutama di Indonesia dan Asia Tenggara. Di Negara Barat tempe dikenal sebagai salah satu protein alternatif pengganti daging. Tempe merupakan makanan berbahan dasar kedelai yang difermentasi oleh jamur (Yang dkk., 2018). Mikroorganisme yang memainkan peran penting dalam proses pembuatan tempe adalah jamur dari Genus *Rhizopus*. Produk olahan makanan fermentasi lebih tinggi nilai gizinya untuk dikonsumsi dari pada yang tidak difermentasi karena peran dari mikroorganisme (Guixer dkk., 2017). Dibandingkan dengan kedelai tanpa fermentasi, tempe memiliki kualitas dan gizi yang lebih baik dalam pencernaan karena produksi

enzim selama fermentasi (Yang dkk., 2018). Selama proses fermentasi senyawa organik yang kompleks dipecah oleh mikroorganisme serta dapat memberikan berbagai karakteristik fungsional pada makanan diluar fungsi nutrisi utama kedelai (Guixer dkk., 2017). Menurut penelitian Razie & Widawati, (2018) umur simpan tempe dengan perlakuan pengemasan vakum dan plastik yaitu maksimal 4 hari. Tempe mengandung beberapa senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan diantaranya folat, vitamin B12, vitamin B6, dan isoflavon (ganistein) (Mo dkk., 2013).

Folat yang juga dikenal sebagai vitamin B9 yaitu istilah umum yang mengacu pada berbagai turunan asam folat. Asupan asam folat yang cukup dapat untuk mencegah abnormal saraf dan anemia. Asupan asam folat di negara-negara umumnya tidak mencapai asupan harian yang direkomendasikan. Jadi, penting untuk mempelajari sumber pangan yang mengandung asam folat dan cara alami untuk meningkatkan asupan asam folat. Vitamin B12 disintesis oleh beberapa bakteri dan archaea, dengan demikian makanan yang berasal dari tumbuhan dapat mengandung vitamin B12 jika difermentasi terlebih dahulu. Kekurangan vitamin B12 dapat menyebabkan gangguan dalam pembelahan sel dan neuropati (Mo dkk., 2013). Tempe juga dapat melindungi neuron terhadap stres oksidatif dan mengurangi gangguan memori (Chan dkk., 2018).

Selama ini produk olahan tempe masih terbatas, sehingga pengembangan pengolahan seperti menjadi minuman susu tempe sangat diperlukan untuk lebih memperkaya bentuk olahan tempe. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengolah tempe menjadi susu tempe seperti yang dilakukan oleh Jauhari dkk., (2014) dengan tujuan memanfaatkan minuman tempe sebagai minuman olahraga yang berguna untuk memulihkan kerusakan otot. Beberapa laporan telah menemukan jika penyerapan isoflavon lebih efektif dari matriks cair kedelai makanan seperti susu kedelai atau susu tempe dari pada bentuk padat (Eslami & Shidfar, 2019). Menurut penelitian Abdullah dan Asriati., (2016) susu tempe memiliki nilai kesukaan netral yaitu 3 dari skala 5, yang berarti bahwa minuman susu tempe perlu ditingkatkan kualitasnya supaya lebih berkembang dimasyarakat.

2.3 Protein Kunitz *Inhibitor Trypsin* (KIT)

Inhibitor trypsin termasuk dalam *protease inhibitor*. Adanya *protease inhibitor* pada tanaman merupakan bentuk pertahanan alami yang dikembangkan oleh tanaman untuk melindungi diri dari serangga (Liliana dkk., 2019). *Protease inhibitor* adalah senyawa yang apabila ditambahkan dalam campuran enzim protease dan substrat akan mengikat enzim protease tersebut dan menurunkan kecepatan pemecahan substrat (Liu, 1999). *Protease inhibitor* telah terbukti mengurangi ketersediaan nutrisi dan menyebabkan penghambatan pertumbuhan (Gemede & Ratta dkk., 2014; Oyedeji dkk., 2018). *Protease inhibitor* memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim proteolitik dalam saluran pencernaan hewan (Gemede & Ratta, 2014). *Protease inhibitor* dapat larut dalam air dan menyusun 0,2-2% dari total protein kacang-kacangan. Kedelai mengandung aktivitas *protease inhibitor* yang paling tinggi dari kacang-kacangan yang lain (Kanetro dkk., 2002).

Protease inhibitor dalam kedelai diketahui menghambat aktivitas enzim *trypsin* sehingga dikenal sebagai *Inhibitor Trypsin*. *Inhibitor trypsin* merupakan inhibitor yang dikelompokkan dalam *serine protease inhibitor* (Kanetro dkk., 2002). *Inhibitor trypsin* dapat menghambat enzim *trypsin* dalam menghidrolisis gelatin (Desphande, 2002). Jumlah *inhibitor trypsin* sekitar 1,7% dari total protein (Tabel 1) (Preece dkk., 2017) (Tabel 1). Enzim *trypsin* berfungsi mengkatalis hidrolisis protein dan polipeptida menjadi asam amino. Menurut penelitian Kanetro dkk., (2002) dalam suspensi kedelai mentah terdapat faktor yang menghambat aktivitas tripsin dalam mencerna kasein yang dilakukan secara *in vitro*. *Inhibitor trypsin* tersebut merupakan penghambat yang kompetitif. Kompleks enzim-inhibitor yang terbentuk sangat stabil, dan aktifitas enzim dapat dihambat dengan sempurna. Pengikatan *inhibitor trypsin* dengan enzim tripsin diawali terjadi pada sisi aktif yang sama dengan apabila enzim mengikat substrat protein.

Dua kelompok utama *inhibitor trypsin* pada kedelai yaitu protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) dan *Bowman-Birk Inhibitor* (BBI) (Frozier dkk., 1997). Protein KIT hanya ditemukan pada beberapa jenis kacang-kacangan yaitu kedelai dan kecipir. Sedangkan BBI ditemukan pada semua jenis kacang-kacangan. Kandungan Cys dalam protein KIT lebih sedikit dibandingkan BBI. Protein KIT memiliki

berat molekul relatif rendah yaitu 8-21 kDa (Rawel dkk., 2002) dan disusun oleh 180 residu asam amino yang distabilkan dengan dua ikatan disulfida (Reseland dkk., 1996), sedangkan protein BBI memiliki 70 residu asam amino (Frokier dkk., 1997). Protein BBI memiliki stabilitas lebih besar terhadap panas dari pada protein KIT karena memiliki 7 ikatan disulfida (Reseland dkk., 1996). Komposisi asam amino protein BBI menunjukkan kandungan Cys yang sangat tinggi 14 (residu) dan semuanya membentuk ikatan disulfida. *Inhibitor trypsin* ini juga mengandung Asp, Asn, dan Ser yang relatif tinggi. Sedangkan Met, Val, Tyr, dan Phe sedikit, serta pada umumnya tidak mengandung Trp (Reseland dkk., 1996).

Susunan asam amino protein dan sisi reaktifnya dapat digunakan untuk menentukan jenis *protease inhibitor* (Ferrason dkk., 1997). Protein KIT dikelompokkan dalam Arg *inhibitor (reactive site)*, sedangkan BBI dikelompokkan dalam tipe Lys *inhibitor (reactive site)*. Selain *reactive site* protein KIT memiliki *active site* yaitu daerah kontak antara protein KIT dengan enzim tripsin yang melibatkan residu asam amino Asp1, Asn13, Ser60, Pro61, Tyr62, Arg63, Ile64, Arg65, dan His71 (Kanetro dkk. 2002). Sisi aktif *inhibitor trypsin* didefinisikan sebagai bagian dari molekul *inhibitor* yang mengambil bagian dalam terjadinya kontak dengan pusat aktivitas proteinase (enzim tripsin) sehingga membentuk kompleks *proteinase-inhibitor*. Modifikasi pada sisi aktifnya akan mengakibatkan *inhibitor trypsin* kehilangan aktivitasnya. Residu asam amino penyusun sisi aktif diikat oleh ikatan peptida yang disebut ikatan peptida sisi aktif. Ikatan peptida ini mudah mengalami hidrolisis selama pembentukan kompleks *inhibitor-proteinase*. Namun sisi aktif tersebut dipertahankan oleh ikatan disulfida, sehingga konformasinya tidak mengalami perubahan akibat hidrolisis (Reseland dkk., 1996).

Perubahan konformasi dalam molekul protein KIT yang bersifat *antinutrients* dapat ditreatment dengan banyak cara meliputi suhu tinggi, tekanan dan penambahan senyawa polifenol (Vanga dkk., 2018). Protein KIT berbentuk globulin terdiri dari 181 residu asam amino dengan berat molekul 21,5 kDa dan titik isoelektrik pada pH 4,5. Protein KIT bertindak sebagai protein yang melindungi tanaman terhadap proteinase mikroba, namun memiliki komposisi asam amino yang dapat menghambat proses pencernaan pada saat dikonsumsi. Bentuk struktur protein KIT yaitu bulat dengan diameter 3-5 nm dan distabilkan oleh rantai samping hidrofobik. Protein KIT resisten

terhadap panas, bahan kimia, dan enzim denaturasi (pepsin) didalam lingkungan lambung (Vagadia dkk., 2017). Ada tiga jenis *kunitz inhibitor trypsin* (KIT) tipe (Tia, Tib, dan Tic) dalam biji kedelai, yang semuanya terdiri dari 181 residu asam amino dengan 4 Cys dan 2 Met serta memiliki satu situs reaktif tunggal pada posisi yang sama Arg63-Ile64 Tabel1 (Li dkk., 2017). Protein KIT memiliki 2 ikatan disulfida yaitu Cys39-Cys86 dan Cys136-Cys145, oleh karena itu untuk inaktivasi protein KIT, dua ikatan disulfida yang ada didalamnya harus dipisahkan. Hal tersebut bisa dilakukan dengan berbagai cara meliputi perlakuan fisik, kimia dan enzimatik pada kondisi suhu dan waktu berbeda (Vagadia dkk., 2017 ; Li dkk., 2017).

Aktivitas *inhibitor trypsin* berkurang sekitar 40% ketika susu kedelai diberi perlakuan tekanan 200 MPa-300 MPa dan pada suhu 55°C-75°C. Meskipun ada pengurangan yang cukup besar dalam aktivitasnya, struktur sekunder protein KIT umumnya dipertahankan, karena adanya ikatan disulfida. Pemanasan protease inhibitor pada suhu 80°C selama satu jam, kemudian dilakukan pendinginan menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan konformasi jika dibandingkan dengan struktur alaminya dan 96% aktivitsnya masih ada (Kenetro dkk., 2002). Studi sebelumnya juga menunjukkan bahwa perubahan suhu dan tekanan dapat menyebabkan perubahan fisikokimia yang signifikan pada residu asam amino (Vagadia et al., 2016). Namun, dalam kasus molekul protein KIT, adanya empat residu sistein (Cys39, Cys86, Cys136 dan Cys145) mengarah pada pembentukan dua ikatan disulfida antara Cys39-Cys86 dan Cys136-Cys145 yang menstabilkan struktur protein. Bagian dari residu Cys menunjukkan pentingnya residu triptofan (Trp 39 dan 117) dalam memelihara stabilitas molekul protein KIT. Residu ditemukan sebagai bagian yang dikenal sebagai untaian β -sheet. Residu asam amino Trp93 memiliki kontribusi rendah pada permukaan sedangkan Trp117 memiliki pengaruh lebih tinggi dalam menentukan interaksi protein KIT yang ada dipermukaan. Dalam kasus residu sistein (Cys), area permukaan sering digabungkan menjadi ikatan disulfida seperti yang terlihat dalam residu asam amino Cys136 dan Cys145 (Vanga dkk., 2018).

Inhibitor trypsin seperti protein KIT dalam kedelai mentah menyebabkan penghambatan pertumbuhan, hipertrofi pankreas dan hiperplasia pada hewan percobaan (Rawel dkk., 2002). *Inhibitor trypsin* tahan terhadap enzim protease, namun akan *inactive* ketika

struktur kimianya berubah oleh berbagai perlakuan sehingga bisa lebih mudah untuk dicerna. Perlakuan panas merupakan salah satu perlakuan yang dapat merubah struktur molekul protein, namun kerugiannya bisa merusak nutrisi protein yang lain (Vagadia dkk., 2017). Konsumsi kedelai dan teh hijau, salah satunya atau dalam kombinasi akan meningkatkan potensi antioksidan total dari hiperkolesterolemia dan hanya kombinasi kedelai dan teh hijau yang menurunkan kadar kolesterol total (Tang dkk., 2019).

2.4 Protein *Lipoxygenase* (LOX)

Protein *Lipoxygenase* (LOX) merupakan enzim yang mengandung besi dengan distribusi luas pada tumbuhan dan hewan. Pada tumbuhan, LOX dapat mengkatalis oksidasi asam linoleat, sedangkan pada mamalia untuk oksidasi asam arakidonat (Tsolaki dkk., 2018). Protein LOX mengandung zat besi dioksigenase yang bertanggung jawab untuk pembentukan hidroperoksida dari asam lemak tak jenuh ganda seperti linoleat (Zhang dkk., 2019) dan dapat mengkatalisasi oksigen asam lemak tak jenuh ganda atau esternya yang mengandung *cis*, *cis*-1, 4-pentadiena untuk membentuk monohidroperoksida sebagai produk utama. Produk olahan dari protein LOX telah menjadi fokus minat komersial yang penting karena aktivitasnya yang dapat menghasilkan rasa tidak menyenangkan (Yenofsky dkk., 1998) akibat oksidasi asam lemak tak jenuh ganda (Vagadia dkk., 2017) dan juga dapat menimbulkan aroma tidak menyenangkan karena aldehida aromatik dan alkohol yang dihasilkan dari hidroperoksida (Yenofsky dkk., 1998).

Empat isozim LOX telah diidentifikasi dalam biji kedelai dengan jumlah 1%-2% dari total biji protein Tabel 1 (Yenofsky dkk., 1998). Biji kedelai umumnya mengandung tiga isozim *lipoxygenase* yang mendominasi yaitu LOX I, II dan III. Enzim-enzim tersebut bertanggung jawab atas rasa khas kedelai, dan berdampak merugikan bagi yang mengkonsumsinya. Fungsi protein LOX telah banyak dikaitkan dengan pertumbuhan dan perkembangan tanaman, respon penuaan, respons luka, pertahanan terhadap hama penyakit dan penyimpanan nitrogen sementara dalam jaringan vegetatif (Junghans dkk., 2004). Pada tumbuhan protein LOX mengkatalisasi oksidasi asam linoleat. Struktur model 3D kristal protein kedelai LOX-1 yang tersedia dari *Protein Data Bank* diperoleh dari kristalisasi enzim

murni. Interaksi senyawa fenolik alami dengan protein LOX memiliki signifikansi besar karena enzim ini dianggap sebagai target potensial untuk aktivitas biologis senyawa fenolik (Zhang dkk., 2019). Protein LOX memiliki dua domain. Domain I merupakan domain yang kecil karena terdiri dari 146 residu amino. Bagian enzim ini tidak memiliki analog pada lipoksigenase mamalia dan dapat dihilangkan dengan proteolisis tanpa kehilangan aktivitas. Domain II terdiri dari 693 dan berisi situs yang aktif. Sisi aktif protein LOX yaitu pada His 494-Ala506 dan Ile685-His690 (Tabel 1) (Nelson, & Seitz, 1994).

Tabel 1. Jenis protein antinutrisional dalam kedelai

No	Jenis Protein	Jumlah Protein (%)	Active Site	Referensi
1.	<i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT)	1.7 %	Asp1, Asn13, Pro60, Ser61, Tyr62, Arg63, Ile64, Arg65, His71, Cys39, Cys86, Cys136, dan Cys145	(Kanetro dkk., 2002; Li dkk., 2017; Preece dkk., 2017; Vanga dkk., 2018)
2.	<i>Lipoxygase nase</i> (LOX)	1-2 %	His494-Ala506 Ile685-His690	(Nelson & Scitz, 1994 dan Yenofsky dkk., 1998)

2.5 Teh (*Camelia sinensis*)

Teh (*Camellia sinensis*) merupakan salah satu bahan herbal untuk minuman populer diseluruh dunia dan dikonsumsi oleh dua pertiga dari populasi dunia (Bose, 2016) terutama karena rasa yang unik dan potensinya bagi kesehatan (Zhang., 2019). Teh adalah salah satu minuman aromatik (Ting dkk., 2017). Kandungan senyawa pada teh meliputi polifenol, flavonoid dan katekin (Silva dkk., 2018). Khasiat utama teh berada pada komponen bioaktifnya yaitu polifenol. Teh banyak dipelajari secara intensif karena adanya senyawa polifenol yang bermanfaat bagi kesehatan (Lasekan & Lasekan, 2012).

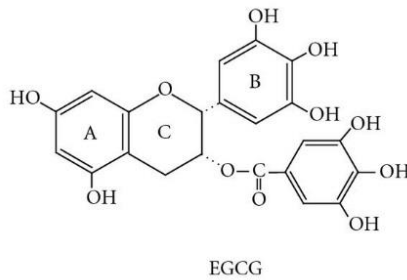
Polifenol juga banyak terdapat pada buah-buahan, sayuran, sereal, anggur, teh, sari buah dan minyak zaitun (Magrone & Jirillo, 2018).

Teh mengandung bermacam-macam senyawa, namun komponen yang paling signifikan yaitu katekin atau polifenol. Polifenol teh, dikenal sebagai katekin dengan jumlah 30-42% dari berat kering. Katekin mengandung kerangka *benzopyran* dengan gugus fenil yang tersubstitusi pada posisi 2 dan hidroksil (atau ester) berfungsi pada posisi 3 (Bose, 2016). Senyawa fenolik secara struktur kimia sebagai gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik. Senyawa fenolik dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok: senyawa fenolik dasar dan polifenol (Ozidal dkk., 2013). Polifenol merupakan suatu senyawa yang terikat pada gugus-gugus hidroksil dalam bentuk cincin benzena. Katekin merupakan senyawa dominan dari polifenol (Martiningsih dkk., 2010) dan mewakili 85% dari total polifenol (Al-Hanish dkk., 2016). Katekin dapat membantu dalam pengawet, memberikan warna, dan rasa dari minuman (Green dkk., 2007). Katekin mengandung kerangka *benzopyran* dengan gugus fenil (Al-Hanish dkk., 2016). Tujuh jenis katekin teh telah diidentifikasi meliputi (-)-catechin (C), (+)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), (-)-gallocatechin-3-gallate (GCG) dan (-)-catechin-3-gallate (CG) (Bose, 2016; Moumita dkk., 2016).

Epigallocatechin gallate (EGCG) telah diidentifikasi sebagai katekin utama yang ada pada teh (Silva dkk., 2018) (Gambar 1) dan paling aktif secara biologis. Senyawa EGCG dapat dengan mudah teroksidasi dalam lingkungan berair, terutama pada pH netral dan basa. Bioavailabilitas dan stabilitas EGCG dapat ditingkatkan dengan kompleksasi bersama protein. Di antara jenis katekin, EGCG memiliki afinitas pengikatan tertinggi terhadap protein (Al-Hanish dkk., 2016). Senyawa fenolik secara kimiawi terstruktur sebagai gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik. Senyawa fenolik dapat membentuk kompleks dengan komponen makanan lainnya, termasuk juga polifenol yang menyebabkan perubahan sifat struktural, fungsional dan nutrisi. Interaksi senyawa fenolik dengan protein dapat menyebabkan perubahan sifat fisiko-kimia protein seperti kelarutan, stabilitas termal, dan pencernaan. Kompleks protein-fenolik dapat dihasilkan dari ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Ozidal dkk., 2013).

Katekin memiliki sifat peka terhadap oksidasi, cahaya, dan pH. Katekin juga memiliki rasa yang pahit dan sedikit larut dalam air (Fang & Bhandari, 2010). Adanya jumlah *galloyl* pada cincin-C menjadi penting keberadaannya dalam katekin. Tingkat *galloyl* pada EGCG secara signifikan lebih tinggi dari EC dan EGC. *Galloyl* EGCG menunjukkan kemampuan mengikat secara signifikan lebih dari *Non-Galloyl* EC dan EGC karena adanya cincin-C yaitu cincin aromatik tambahan dan tiga gugus hidroksil yang dapat membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Jumlah dan posisi gugus hidroksil pada cincin aromatik menentukan kapasitas antioksidan polifenol (Al-Hanish dkk., 2016). Keberadaan satu atau lebih cincin aromatik dan gugus hidroksil dalam struktur kimia senyawa fenolik dapat meningkatkan afinitas pengikatannya untuk situs yang berbeda dari struktur molekul protein (Alu'datt dkk., 2018).

Polifenol mewakili sumber utama antioksidan (Ozdal dkk., 2013). Menurut penelitian Magrone & Jirillo., (2018) suplementasi polifenol pada kultur limfomonosit dapat memulihkan jalur tolerogenik dengan peningkatan IL-10 dan penurunan sitokin inflamasi. Manfaat polifenol dalam kesehatan yaitu sebagai agen pereduksi. Menurut Zhang dkk., (2019) polifenol telah dikenal sebagai inhibitor sejak lama, penggunaannya meningkat karena sebagai sumber antioksidan alami yang berfungsi untuk membersihkan radikal bebas (Zhang dkk., 2019). Antioksidan memainkan peran utama dalam perlindungan jaringan tubuh terhadap stres oksidatif. Konsumsi makanan yang kaya polifenol telah dikaitkan dengan penurunan kadar kolesterol, risiko kanker, stroke, penyakit jantung koroner (Bose dkk., 2016), dan meningkatkan aktivitas antioksidan serta antimikroba (Ting dkk., 2017). Adanya faktor *antinutrients* dari protein kedelai dapat dihilangkan atau diminimalisir oleh pemrosesan yang tepat (Oyedeggi dkk., 2018), salah satunya bisa dengan penambahan teh ke dalam susu tempe seperti yang dilakukan dalam penelitian ini.



Gambar 1. Struktur Katekin EGCG (PDB).

Keterangan :

A : Gugus *Hydroxyphenyl* (5,7 dihydroxy)

B : Gugus *Hydroxyphenyl* (3,4,5 trihydroxyphenyl)

C : Gugus *Chroman*

2.6 Mekanisme Koagulasi Protein

Ada banyak parameter yang mempengaruhi interaksi kompleks protein-fenolik meliputi suhu, pH, jenis protein, konsentrasi protein jenis dan struktur senyawa fenolik, konsentrasi garam, serta penambahan reagen tertentu. Interaksi protein dan senyawa fenolik merupakan salah satu fenomena yang kompleks (Ozdam dkk., 2013). Gugus fenolik adalah donor hidrogen yang sangat baik dan dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karboksil pada protein. Ikatan hidrogen adalah interaksi dari atom hidrogen yang secara non-kovalen melekat pada atom elektronegatif seperti N, O atau S dengan atom elektronegatif lain, dan termasuk interaksi ionik. Sifat interaksi protein-fenolik dalam sistem pangan nabati dapat diklasifikasikan ke dalam dua kelompok sebagai interaksi yang *reversible* (reaksi kimia yang dapat balik) dan *irreversible* (reaksi kimia yang tidak dapat balik) (Alu'datt dkk., 2018).

Dalam interaksi *reversible* dapat membentuk kompleks yang tidak larut dalam larutan melalui interaksi non-kovalen seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik dan gaya *Van der Waals*. Pembentukan protein dan fenolik yang kompleks merupakan hasil dari ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Ozdam dkk., 2013). Sedangkan dalam interaksi yang *irreversible* dapat menyebabkan struktur molekul baru yang menghasilkan peningkatan kelarutan protein dan senyawa fenolik dalam larutan melalui interaksi ikatan kovalen, ikatan

non-disulfida dan *cross-link* (Alu'datt dkk., 2018). Bioaktivitas dan bioavailabilitas polifenol dalam kompleks polifenol-protein dapat dipengaruhi oleh interaksi kovalen. Interaksi hidrofobik dan sifat protein memainkan peran utama denaturasi (Vanga dkk., 2018). Interaksi kovalen atau non-kovalen dapat menyebabkan pengendapan protein melalui interaksi multisite dan interaksi multidentat. Dalam interaksi multisite, beberapa fenolik mengikat satu molekul protein dan dalam interaksi multidentat satu fenolik berikatan dengan beberapa situs protein atau molekul protein (Ozdal dkk., 2013).

Dalam larutan, polifenol dapat membentuk kompleks yang tidak larut dengan protein susu. Ikatan ini dapat mempengaruhi kapasitas perpindahan elektron katekin dengan mengurangi jumlah gugus hidroksil (Al-Hanish dkk., 2016). Ikatan lemah terbentuk antara polifenol teh dengan α -casein dan β -casein melalui interaksi hidrofilik dan hidrofobik. β -casein membentuk kompleks yang lebih kuat dengan polifenol teh dari α -casein, karena lebih hidrofobik β -casein. Senyawa EGCG memiliki pengikatan tertinggi terhadap protein kedelai karena kelompok fungsional *galloyl* dengan beberapa situs pengikatan peptida mampu membentuk interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen dengan protein susu. Polifenol yang dikomplekskan dengan protein tidak akan tertanam didalam protein melainkan terletak dipermukaannya. Struktur molekul dan jumlah gugus hidroksil dari senyawa fenolik memainkan peran penting dalam pengikatan senyawa fenolik alami terhadap protein (Al-Hanish dkk., 2016).

Koagulasi protein bisa disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya perlakuan suhu tinggi atau panas. Mekanisme koagulasi protein karena perlakuan panas terjadi pada saat suhu pemanasan berada diatas suhu denaturasi protein. Struktur protein akan berangsur-angsur terbuka dan beberapa kelompok hidrofobik yang awalnya tertanam didalam molekul menjadi terbuka. Protein yang tidak terlipat cenderung berinteraksi satu sama lain melalui interaksi antimolekul hidrofobik dan akan mengarah pada agregasi protein (jika konsentrasi protein cukup tinggi) (Tang dkk., 2019). Dengan memanaskan susu kedelai, protein asli di dalamnya mengalami penguapan, disosiasi, dan agregasi, menghasilkan pembentukan partikel protein susu kedelai ($d > 40$ nm) dan protein yang larut ($d < 40$ nm). Polifenol diketahui membentuk kompleks dengan protein yang menyebabkan perubahan pada sifat struktural dari kedua senyawa (Ozdal dkk., 2013).

Protein kedelai jauh lebih kompleks dari pada albumin serum sapi dan lisozim. Setelah dipanaskan, protein dalam susu kedelai akan terdenaturasi dan terdisosiasi menjadi subunit, diikuti oleh agregasi antar molekul yang menghasilkan pembentukan agregat protein dan monomer dalam ukuran yang berbeda. Ketika protein kedelai mengalami perlakuan panas maka akan terdenaturasi dan berdisosiasi menjadi polipeptida asam dan basa. Polipeptida basa cenderung mengalami agregasi melalui interaksi hidrofobik, yaitu terbukanya rantai polipeptida kemudian melipat kembali dengan cara yang berbeda (Ozidal dkk., 2013). Senyawa polifenol tumbuhan menunjukkan interaksi yang kuat dengan protein globular dan dapat menyebabkan protein *unfolding*. Polifenol yang lebih besar seperti yang ada pada teh hitam kemungkinan besar untuk membentuk kompleks dengan protein susu. Ikatan ini dapat mempengaruhi kapasitas donasi elektron katekin dengan mengurangi jumlahnya gugus hidroksil yang tersedia dalam larutan (Hasni dkk., 2011).

2.7 Docking Molekuler *In Silico*

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk identifikasi ikatan antara molekul adalah *docking in silico*. Dalam beberapa tahun terakhir, simulasi dinamika molekuler telah digunakan untuk memahami efek dari berbagai metode pemrosesan pada sifat struktural dan stabilitas protein (Vanga dkk., 2018). Teknik pemodelan molekuler dapat memvisualisasikan perubahan struktur pada protein atau enzim selama pemrosesan (Vagadia dkk., 2017). Bioinformatika dapat memprediksi parameter penting molekul protein yang terkait dengan fungsi makanan. Pendekatan *in silico* ini dapat melengkapi proses pemahaman struktur molekul protein makanan, dan menghubungkan sifat-sifat fisiko-kimia molekul dengan fungsi yang ada dalam makanan. Manfaat analisis karakteristik struktur 3D protein yang berinteraksi dengan polifenol yaitu dapat memprediksi sifat fisikokimia dan interaksi hidrofobik atau hidrofilik. Interaksi tersebut tergantung pada situs pengikatan protein. Selain itu dapat membandingkannya dengan data hasil laboratorium, dan literatur tentang informasi molekul (Withana-Gamage & Wanasundara, 2012).

Docking in silico merupakan suatu metode untuk mengkomplekskan antara ligan dan target dalam pendekatan komputasi untuk menganalisis kompleks struktural dan spesifisitas

target (protein target) (Syed & Nighat., 2015). Simulasi *docking in silico* memiliki salah satu tujuan, yaitu untuk memahami tentang pola interaksi yang terjadi antara ligan dengan protein atau protein dengan protein, mengetahui ikatan-ikatan yang ada, mendapatkan informasi tentang kestabilan ikatan dan mengetahui visualisasi sisi aktif protein (Aiello dkk., 2018). Data struktur 3D protein di ambil dari *database Protein Data Bank* (PDB) (García-Nieto dkk., 2019). PDB merupakan sumber data yang menyimpan struktur model tiga dimensi protein dan asam nukleat hasil penentuan eksperimen (dengan kristalografi sinar-X, spektroskopi NMR, dan mikroskopi elektron). PDB menyimpan struktur sebagai koordinat tiga dimensi yang menggambarkan posisi atom-atom dalam protein maupun asam nukleat (Fatchiyah, 2015). Analisis konformasi molekul yang dihasilkan yaitu dalam situs ikatan dan interaksi molekuler. *Docking* juga membahas masalah optimalisasi kompleks berdasarkan prediksi posisi dan orientasi molekul kecil (ligan) kepada sebuah reseptor (makromolekul) dengan energi ikat minimum (García-Nieto dkk., 2019).

Selain *docking* metode lain yang dapat digunakan untuk analisa perubahan konformasi struktural protein akibat perlakuan yaitu metode *Super Impose*. *Super Impose* merupakan metode mensejajarkan beberapa molekul untuk mendeteksi kesamaan dan perbedaan seluruh struktural (Bauer dkk., 2008). Metode *Super Impose* memiliki tujuan untuk membandingkan dua molekul dan dapat menentukan apakah bagian tertentu dari molekul itu hadir atau tidak dalam molekul lain. Tetapi sejumlah ciri-ciri molekul kecil tidak dapat tercermin secara memadai oleh representasi gambar 2D. Perbandingan seluruh protein sangat diperlukan untuk mengetahui perbedaan dua molekul. *WebServer Super Impose* dapat melakukan kinerja pencarian kesamaan struktural 3D. Kesamaan dapat dideteksi antara molekul kecil, bagian besar (*binding sites of proteins*) dari struktur dan seluruh protein. Karena ukuran biomolekul berbeda berdasarkan besarnya, cara membandingkannya yaitu dengan cara mengukur perbandingan yang sebenarnya (Bauer dkk., 2008).

WebServer Super Impose dibuat untuk menangani super posisi struktural molekul dalam arti luas. Kombinasi dari basis data dan algoritma dari berbagai bidang menyediakan kemungkinan untuk mengidentifikasi protein yang sama, senyawa aktif yang serupa dan juga situs pengikatan melalui kesamaan dalam pencarian substruktural (Bauer dkk., 2008). Bagian penting dari banyak program

perbandingan struktur (*Super Impose*) yaitu untuk menghasilkan keselarasan urutan dari struktur (Tai dkk., 2009). *PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) adalah sebuah repositori publik untuk mendapatkan informasi tentang bahan kimia dan aktivitas biologisnya (Kim dkk., 2015), berbagai identitas kimia, termasuk molekul kecil, lipid, karbohidrat, urutan asam amino dan asam nukleat (Kim dkk., 2016).

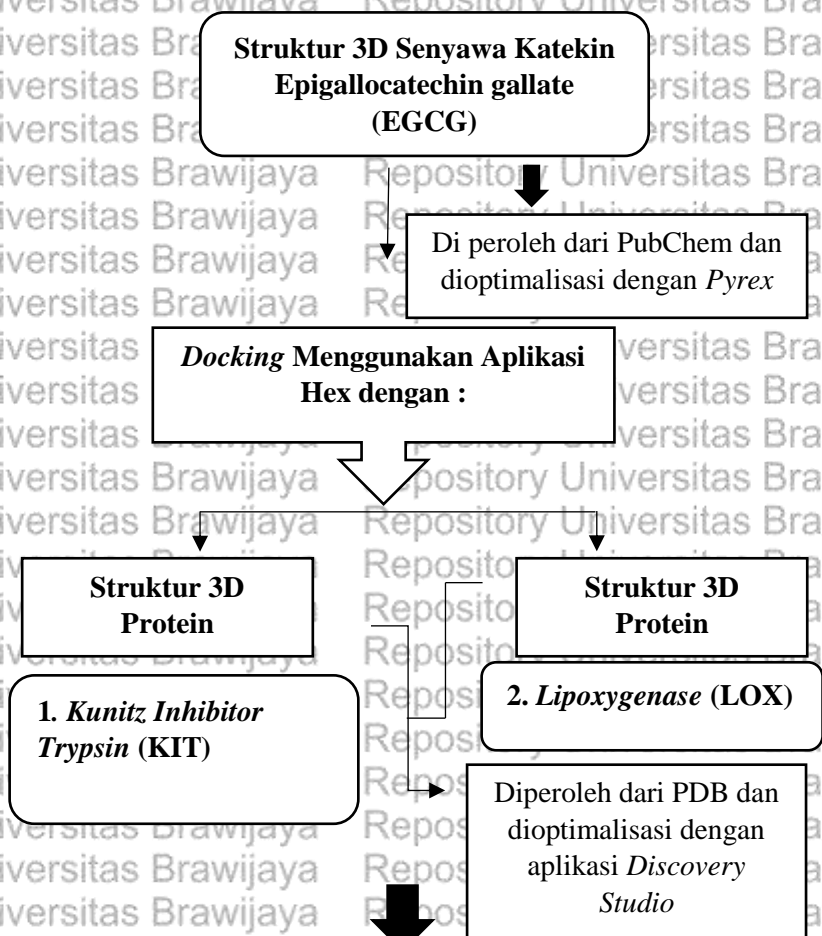
PubChem diluncurkan tahun 2004 yang merupakan Inisiatif *Roadmap* dari *Institutes of Health* AS (NIH) sebagai perpustakaan molekuler. Selama 11 tahun terakhir, *PubChem* telah berkembang menjadi sistem yang cukup besar, berfungsi sebagai sumber daya informasi kimia untuk penelitian ilmiah masyarakat. *PubChem* terdiri dari tiga database yang saling terhubung yaitu *Zat*, *Senyawa* dan *BioAssay* (Kim dkk., 2015). *Uniprot*, *Gen Bank* dan *Protein Database* (PDB) mewakili tiga *database* bioinformatika yang paling tua dan paling banyak digunakan. Masing-masing database melengkapi yang lain dengan berfokus pada aspek yang berbeda pada struktur makromolekul (Murray dkk., 2012).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-November 2019 di Laboratorium Biologi Seluler dan Molekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Kerangka Operasional



**Visualisasi *Docking*
menggunakan
Aplikasi *Discovery***

Didapatkan Hasil

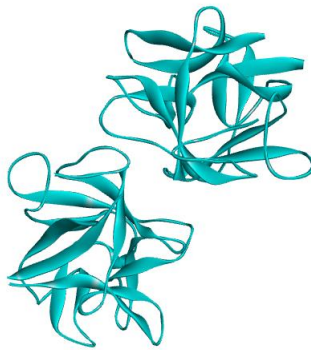
***Super Impose* dilakukan secara online dengan aplikasi
SuperPose Version 1.0 antara:**

1. Protein KIT dengan kompleks KIT-EGCG
2. Protein LOX dengan kompleks LOX-EGCG

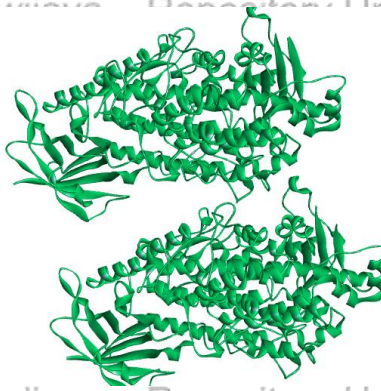
**Interpretasi Data pada
Gambar 6-12 Struktur 3D
Protein KIT dan LOX**

3.3 Pengambilan Data

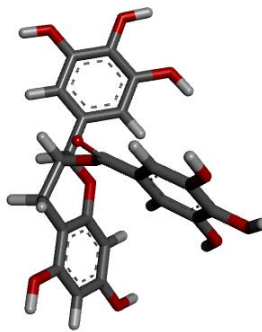
Protein model didapatkan dari *database* PDB (*Protein Data Bank*) pada alamat <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Struktur 3D protein yang digunakan untuk penelitian ini memiliki kode yaitu (PDB:1BA7) untuk protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) (Vanga dkk., 2018) (Gambar 2) dan (PDB:IF8N) untuk protein *Lipoxygenase* (LOX) (Gambar 3) (Tsolaki dkk., 2018). Struktur 3D molekul senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG) diperoleh dari *database National Center for Biotechnology Information PubChem* (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan kode (PubChem CID: 65064) (Gambar 4).



Gambar 2. Protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT).



Gambar 3. Protein *Lipoxygenase* (LOX).



Gambar 4. Senyawa *Epigallocatechin gallate* (EGCG).

3.4 Optimalisasi Protein dan Ligan

Data struktur 3D protein KIT dan LOX sebagai reseptor diunduh dan selanjutnya divisualisasikan menggunakan program *Discovery studio*. Sebelum melakukan *docking in silico* struktur 3D protein KIT dan LOX harus dioptimalisasi terlebih dahulu menggunakan aplikasi *Discovery Studio* untuk menghilangkan ligan alami atau ligan yang masih melekat pada protein (Sumaryada dkk., 2018), sedangkan untuk optimalisasi senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG) sebagai ligan menggunakan aplikasi *software Pyrex*.

3.5 Docking In Silico Protein Tempe dengan Ligan EGCG

Docking dilakukan sebanyak dua kali sebagai validasi penelitian antara reseptor yaitu struktur 3D protein KIT dan LOX dengan ligan yaitu struktur 3D senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG). *Docking* tersebut dilakukan menggunakan *software Hex*. Perhitungan energi juga dilakukan dengan aplikasi *Hex*. Visualisasi 3D hasil *docking* dapat dilihat dengan menggunakan aplikasi *Discovery Studio*. Proses *docking* molekuler bertujuan untuk menemukan konformasi yang optimal antara ligan (L) dan reseptor (R) serta mengetahui energi minimum pengikatan (García-Nieto dkk., 2019).

3.6 Super Impose antara Protein dan Kompleks Hasil Docking

Super Impose dilakukan secara *online* dengan aplikasi *SuperPose Version 1.0*. Langkah pertama buka aplikasi google dan ketik *SuperPose Version 1.0* maka akan menuju pada alamat <http://superpose.wishartlab.com/>. Setelah itu klik “Pilih File” pada bagian *PDB Entry A*, masukkan file struktur 3D protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) dalam format PDB. Maka pada bagian “Pilih File” akan terisi dengan file protein KIT dalam format PDB. Setelah itu klik “Pilih File” pada bagian *PDB Entry B (Optional)* masukkan file kompleks hasil *docking in silico* KIT-EGCG dalam format PDB, maka pada bagian “Pilih File” akan terisi dengan file kompleks KIT-EGCG dalam format PDB. Setelah itu klik “*Submit*” pada bagian bawah.

Selanjutnya pada bagian PDBA dan PDBB pilih “*All Chains*”, setelah itu pilih “*Continue*” maka hasil *SuperImpose* akan keluar. Ada 2 bagian pada *SuperPose Output for Multiple Chain Superposition*

meliputi *SuperPose Output Images* dan *SuperPose Output Text Files*. Pada bagian *SuperPose Output Images* terdiri dari *WebMol* dan *MolScript Superposition Image*. Pada bagian *SuperPose Output Text Files* terdiri dari *Sequence Alignment*, *Superposition (PDB)* dan *RMSD Report*. Pada bagian *RSDM Report* akan ditampilkan nilai *Alpha Carbons*, *Back Bone*, *Heavy* dan *All*. Setelah itu unduh hasil struktur 3D hasil *SuperImpose* pada bagian *Superposition (PDB)* dan visualisasi file dengan aplikasi *Discovery Studio*.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Visualisasi Protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT)

Hasil visualisasi struktur 3D protein KIT (*kunitz inhibitor trypsin*) dengan aplikasi *Discovery Studio* memiliki dua subdomain (A dan B) yang heterodimer (Gambar 2) karena setiap subdomain memiliki jumlah asam amino yang berbeda, pada subdomain A terdapat 165 residu asam amino dan subdomain B memiliki 169 asam amino. Menurut Carbrera-Orozco & Davila-Ortiz., (2010) protein KIT memiliki berat molekul antara 18 sampai 24 kDa, dan mengandung 170 sampai 200 residu asam amino yang distabilkan oleh dua ikatan kovalen disulfida. Hasil visualisasi dengan aplikasi *Discovery Studio* menunjukkan jika *Hydrophobicity* asam amino protein KIT berkisar antara -4,5 sampai 4,5. Bentuk protein dari data struktur PDB *secondary* yaitu *coil* sedangkan untuk bentuk *secondarynya* beragam mulai dari *coil*, *turn*, *sheet* dan *helix*. Struktur 3D yang tervisualisasi yaitu struktur sekunder α -*helix* dan β -*sheet*. *Hybridization* pada protein KIT yaitu Sp2 dan Sp3. Jenis ikatan dalam protein KIT yaitu *single*, *double*, *Aromatic*, dan *partial double*. *Group* protein KIT meliputi *Disulfide Residues* dengan size 8, *Backbone* 1.336, *Sidechain* 1.160, *Hydrophobic* 127, *Hydrophilic* 110, *Acidic* 45 dan *Basic* 39. *Element* asam amino pada protein KIT meliputi *nitrogen* (N), *carbon* (C), *oxygen* (O), dan *sulfur* (S). Menurut Campbell dkk., (2010) karbon, oksigen, hidrogen, dan nitrogen merupakan unsur-unsur esensial kehidupan yang menyusun sekitar 96% materi hidup.

Protein KIT memiliki empat asam amino Cys atau *Cysteine* (Cys39, Cys86, Cys136, Cys145) yang membentuk dua jembatan disulfida intramolekul (Cys39-Cys86 dan Cys136-Cys145) (Gambar 3) dan dua asam amino Met (Met84, Met114) serta memiliki satu situs reaktif tunggal pada posisi Arg63-Ile64. Meskipun jembatan disulfida tidak terletak didekat *reactive site*, pemecahan ikatan disulfida dapat mengakibatkan perubahan konformasi pada protein KIT dan akan menghilangkan fungsinya (Li dkk., 2017; Vanga dkk., 2018). Menurut Vagadia dkk., (2017) jembatan disulfida juga disebut ikatan kovalen, terbentuk di tempat dua monomer sistein (Cys), yaitu asam amino bergugus sulfihidril (-SH) pada rantai sampingnya dan dirapatkan oleh pelipatan protein. Sulfur pada salah satu sistein berikatan dengan

sulfur sistein kedua, dan jembatan disulfida menyambungkan bagian-bagian protein tersebut (Campbell dkk., 2010). Selain *reactive site* protein KIT memiliki *active site* yaitu daerah kontak antara protein KIT dengan enzim tripsin yang melibatkan rsidu asam amino Asp1, Asn13, Ser60, Pro61, Tyr62, Arg63, Ile64, Arg65, dan His71 (Kanetro dkk. 2002). Setelah divisualisasikan dengan aplikasi *Discovery Studio* bagian *active site* asam amino memiliki nilai *Hydrophobicity* -4,5 sampai 45. Bagian PDB *Secondary (coil)* dan *Secondary* yaitu *coil* dan *turn*. Atom-atom pada bagian *active site* asam amino protein KIT memiliki *Element* yaitu oksigen, karbon, hidrogen, dan nitrogen, *Hybridization* (Sp₂, Sp₃ dan *none*). Ikatan yang ada pada *active Site* adalah *single, double, partial double* dan *aromatic*.

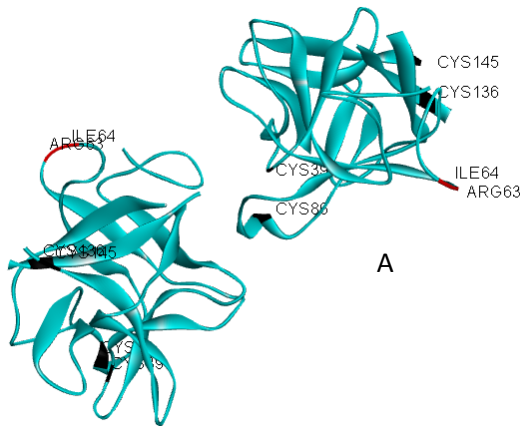
Hasil visualisais struktur protein KIT dengan aplikasi *Discovery Studio* pada bagian ikatan disulfida (Cys39-Cys86 dan Cys136-Cys145) memiliki nilai *Hydrophobicity* yang sama yaitu 2,5. Struktur 3D pada PDB *Secondary* semuanya *Coil* sedangkan struktur *Secondary*nya beragam yaitu Cys39 (*Coil*), Cys86 (*Helix*), Cys136 (*Sheet*) dan Cys145 (*Turn*). *Element* atom pada residu asam amino memiliki urutan yang sama antara ikatan antara Cys39 dengan Cys86 dan Cys136 dengan Cys145 (*nitrogen, carbon, oxygen, carbon* dan *sulfur*). *Hybridization* pada semua residu asam amino protein KIT juga sama yaitu Sp₂ dan Sp₃. Visualisasi tipe ikatan pada molekul disulfida sebelum *docking* dengan protein yaitu sama (*single* dan *double*) dan urutannya pun juga sama, nilai *Lenght* berkisar antara 1,2 sampai 1,8. Bukti adanya ikatan disulfida juga ada pada data *group* yang meliputi *disulfide residues, backbone, sidechain, hydrophobic, hydrophilic, acidic, dan basic* dengan *size* antara 8 sampai 1.336.

Protein KIT termasuk dalam serine protease inhibitor. Protease inhibitor dapat diklasifikasikan berdasarkan sisi reaktifnya, protein KIT dikelompokkan dalam Arg inhibitor (sisi reaktifnya Arg). Modifikasi pada sisi reaktif dan sisi aktif akan mengakibatkan inhibitor kehilangan aktivasinya (Kanetro dkk., 2002). Protein KIT hanya ditemukan pada beberapa jenis kacang-kacangan, yaitu kedelai dan kecipir (Kanetro dkk., 2002). Protein KIT dianggap sebagai faktor *antinutrients* utama dalam kedelai dalam tubuh yang mengkonsumsinya (Haidar dkk., 2018). Tingginya kadar protein ini dapat menghambat enzim pencernaan, sehingga mempengaruhi kecernaan protein (Haidar dkk., 2018). Protein KIT dapat membentuk kompleks yang tidak aktif dengan enzim tripsin atau kimotripsin

sehingga kadar enzim pencernaan ini berkurang dan mengakibatkan kesulitan proses proteolisis dan penyerapan asam amino. Satu molekul protein KIT dapat menonaktifkan satu molekul enzim tripsin (Carbrera-Orozco & Davila-Ortiz, 2010) sehingga dapat menyebabkan penyakit tertentu seperti hipertrofi pankreas (Haidar dkk., 2018). Fungsi enzim tripsin yaitu untuk mengkatalisis hidrolisis protein dan polipeptida menjadi asam amino. Hidrolisis ini terjadi pada ikatan karboksil asam amino lisin dan arginin (Kanetro dkk., 2002). Tripsin dan kimotripsin disekresikan oleh pankreas dan diaktivasi ketika keduanya terletak secara aman di dalam ruang ekstraseluler dalam duodenum (Campbell dkk., 2010).

Inhibitor tripsin ini dapat mempertahankan kompleksnya (enzim tripsin) dengan ikatan disulfida sehingga ikatannya stabil. Inhibitor protease yang terdapat pada kacang-kacangan memiliki efek negatif pada hewan ketika dikonsumsi. Namun protein KIT memiliki fungsi utama di dalam tanaman yaitu mengatur protein yang disimpan dalam tubuh sebelum dan selama perkecambahan biji dengan menghambat protease endogen. Selain itu sebagai pelindung terhadap serangga dan mikroorganisme. Mekanisme penghambatan enzim tripsin oleh protein KIT yaitu diawali ketika protease inhibitor (protein KIT) berikatan dengan enzim tripsin pada sisi aktif yang sama dengan apabila enzim tripsin berikatan dengan substratnya (Carbrera-Orozco & Davila-Ortiz, 2010). Enzim tripsin mengikat inhibitor protease (protein KIT) pada residu arginin dan lisin dengan ikatan-ikatan hidrogen yang terbentuk antar ikatan-ikatan peptida disepanjang rantai peptida pada bagian sisi aktif. Inhibitor akan mengikat sangat kuat dan tidak dapat dihidrolisis karena konformasi inhibitor pada sisi pengikatnya sangat tidak leluasa. Sisi aktif inhibitor yang mengambil bagian dalam terjadinya kontak dengan pusat aktivitas proteinase membentuk kompleks dengan enzim tripsin. Kompleks enzim-inhibitor yang terbentuk pada penghambatan tripsin oleh KIT sangat stabil dan enzim dapat dihambat dengan sempurna. Kompleks enzim-inhibitor yang terbentuk tidak dapat didegradasi dan direabsorpsi, sehingga tubuh akan kekurangan asam amino endogenous khususnya asam amino Cys, karena protease pankreas mengandung asam amino Cys yang tinggi. Selain itu kekurangan asam amino juga disebabkan oleh proteolisis dari *dietary protein* tidak sempurna dengan adanya inhibitor. Hal tersebut menyebabkan pertumbuhan terhambat. Apabila

dalam diet kedelai ditambahkan asam amino Cys ternyata dapat memperbaiki kecepatan pertumbuhan (Kanetro dkk., 2002).



Gambar 5. Struktur 3D Protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT).

Keterangan :

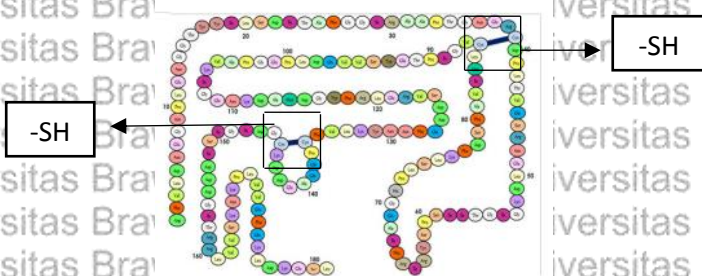
Biru : Struktur 3D Protein KIT

Merah : *Active Site* Protein KIT

Hitam : *Disulfida Bridge* pada Protein KIT

A : Subdomain A

B : Subdomain B



Gambar 6. Struktur Primer dari Protein KIT Kedelai (Ikatan Disulfida atau Sulfhidril (-SH) ditunjukkan dalam Kotak Berwarna Hitam) (Penalvo dkk., 2004).

4.2 Visualisasi Protein *Lipoxygenase* (LOX)

Hasil visualisasi struktur 3D protein *lipoxygenase* (LOX) menggunakan aplikasi discovery studio memiliki 2 domain dengan masing-masing memiliki jumlah asam amino sebanyak 839 (Gambar 4) dan menurut Chedea & Jisaka, (2011) protein LOX dalam kedelai terdiri dari 839 residu asam amino yang berada dalam 2 subdomain. Subdomain I yaitu residu subdomain N-terminal dengan 146 residu asam amino, dan subdomain II yaitu C-terminal dengan 693 residu asam amino. Secara keseluruhan, struktur 3D protein LOX menunjukkan kandungan α -heliks sebesar 38% dan β -sheet sebesar 13,9%. Hasil visualisasi dengan menggunakan aplikasi *Discovery studio* menunjukkan nilai *Hydrophobicity*nya memiliki rentang antara -4,5 sampai 45. *Hybridization* meliputi Sp², Sp³, *None* dan *Square Planar*. PDB *Secondary* protein LOX berbentuk *Coil*, sedangkan untuk *Secondary*nya yaitu *Coil*, *Sheet*, *Helix*, dan *Turn*. Struktur 3-D protein LOX telah ditentukan dengan metode difraksi sinar-X kristal tunggal.

Protein LOX berbentuk *ellipsoid* dengan dimensi 90 x 65 x 60 Å dan massa molekul sebesar 95 kDa (Chedea & Jisaka, 2011). Protein LOX memiliki 42.124 atom, dengan *Element* yang terdiri dari nitrogen, karbon, oksigen, hidrogen, sulfur dan iron. Menurut Campbell dkk., (2010) protein tersusun atas atom-atom karbon yang berikatan satu sama lain dan berikatan dengan atom unsur lain. Diantara semua unsur kimia, karbon (C) memiliki kemampuan membentuk molekul-molekul yang besar, kompleks dan beranekaragam. Unsur lain yang menyusun protein meliputi hidrogen (H), oksigen (O), nitrogen (N), sulfur (S), dan fosfor (P). Senyawa yang mengandung karbon akan bersifat organik. Senyawa organik meliputi molekul sederhana seperti metana sampai berukuran raksasa seperti protein dengan ribuan atomnya. Sebagian besar senyawa organik mengandung atom hidrogen (Campbell dkk., 2010).

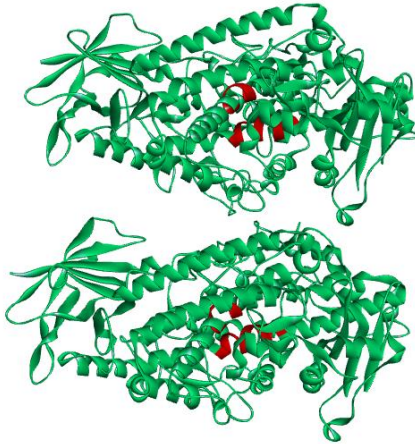
Protein LOX banyak ditemukan pada tanaman, jamur, dan hewan. Protein LOX termasuk dalam *family* protein monomerik besar dengan kofaktor besi non-heme, non-sulfur, mengandung dioksigenase yang mengkatalisasi oksidasi asam lemak tak jenuh ganda sebagai substrat seperti asam linoleat untuk menghasilkan hidroperoksida (Chedea & Jisaka, 2011). Inhibitor protease seperti protein LOX memiliki dampak negatif terhadap kesehatan manusia dan hewan ketika sering

dikonsumsi (Haider dkk., 2018). Selain itu menurut Yenofsky dkk., (1998) protein LOX dapat menghasilkan rasa yang tidak menyenangkan yang timbul dari aldehida aromatik dan alkohol yang dihasilkan dari metabolit sekunder hidroperoksida. Rasa yang kurang menyenangkan dari susu kedelai disebabkan oleh beberapa keton dan aldehida, terutama *hexanal* dan *heptanals* yang diproduksi melalui oksidasi yang dikatalisasi oleh enzim LOX. Selain itu protein LOX terlibat dalam pembentukan aroma yang tidak diinginkan dibanyak produk tanaman dan membahayakan status anti-oksidan (Chedea & Jisaka, 2011).

Peroksidasi lipid umum terjadi pada semua sistem biologis, baik yang muncul dalam proses perkembangan tanaman maupun yang diatur oleh lingkungan. Asam lemak tak jenuh ganda hidroperoksida, disintesis oleh enzim LOX. Namun sintesis LOX juga sangat bermanfaat karena menjadi langkah awal dalam interaksi tanaman dengan patogen, serangga, dan stres abiotik (Chedea & Jisaka, 2011). *Active site* protein LOX meliputi His494, Gln495, Leu496, Met497, Ser498, His499, Trp500, Leu501, Asn502, Thr503, His504, Ala505, ALA 506 (Nelson & Scitz, 1994) dan ILE685, ALA686, SER687, Ala688, Leu689, His690. Hasil visualisasi dengan aplikasi *Discovery Studio* menunjukkan nilai *Hydrophobicity active site* berkisar antara -3,5 sampai 4,5, PDB *secondarynya* yaitu berbentuk *Coil* dan struktur *Secondarynya Helix* dan *Turn*. *Typenya single* dan *double* dengan panjang berkisar antara 0,38 sampai 1,79. Data protein LOX grup terdiri dari *hetatm* dengan *size 2, backbond, sidenchain, hydrophobic, hydrophilic, acidic, dan basic (protein groups)* dengan *sizenya* antara 199 sampai 16.230.

Dalam hal struktur dan fungsi, protein LOX termasuk protein yang unik, karena kofaktor logamnya adalah ion tunggal yang terikat oleh rantai samping asam amino disekitarnya dan kelompok karboksilat dari C-terminal, serta inhibitornya mengikat ke atau dekat kofaktor Fe. Protein LOX dapat dihambat oleh sejumlah besar bahan kimia, beberapa diantaranya juga berfungsi sebagai *co-substrat*. Selain peran fisiologisnya, penghambatan LOX oleh flavonoid tampaknya bersifat lebih kompleks. Studi inhibitor LOX dari kacang menunjukkan bahwa komponen antioksidan fenolik efektif sehingga dapat digunakan untuk melindungi lipid makanan terhadap oksidasi. Penelitian yang dilakukan membuktikan bahwa aktivitas protein LOX dari biji kacang polong dapat secara efektif dihambat oleh beberapa

senyawa fenolik. Flavonoid seperti katekin dan *quercetin* sangat menghambat aktivitas protein LOX. Interaksi protein LOX dengan inhibitor banyak digunakan sebagai pendekatan teoritis untuk industri makanan (Chedea & Jisaka, 2011).



Gambar 7. Struktur 3D Protein *Lipoxygenase* (LOX).

Keterangan :

Hijau : Protein LOX

Merah : *Active Site* pada protein LOX

A : Domain A

B : Domain B

4.3 Visualisasi Senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG)

Hasil visualisasi struktur senyawa EGCG (Gambar 5) menggunakan aplikasi *Discovery Studio* memiliki *element* atom antara lain *oxygen*, *carbon*, dan *hydrogen* dengan *hybridisasi*nya Sp^3 , Sp^2 dan *none*. Ikatannya senyawa EGCG terdiri dari O-C, O-H, C-C dan C-H, *parent* (LIG1), tipe ikatan terdiri dari *single*, *double* dan *aromatic* dengan panjang 0,96 sampai 1,54. Bagian *group* EGCG terdiri dari *hetatm* (EGCG) memiliki *size* 51 dan *ligand* 1 dengan *size*

1.

Senyawa fenolik memiliki struktur kimia yang sangat beragam seperti beberapa gugus fenolik dan gugus fungsi yang berkontribusi pada aktivitas biologis (Fang & Bhandari, 2010). Menurut Ozdal dkk., (2013) senyawa fenolik secara kimiawi memiliki struktur gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatik. Kegunaan utama fenolik dalam makanan yaitu berkontribusi terhadap warna, rasa, sifat biologis dan fungsi kesehatan. Fenolik ini juga termasuk dalam senyawa bioaktif (Allu'datt dkk., 2018). Efektivitas polifenol tergantung pada stabilitas, bioaktivitas, dan ketersediaan bahan aktif dalam bahannya (Fang & Bhandari, 2010).



Gambar 8. Struktur 3D Senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG).

4.4 Analisis Interaksi Protein KIT dengan Senyawa EGCG

Interaksi antara protein dan ligan dilakukan dengan *docking* menggunakan aplikasi *software* HEX 8.0 yang selanjutnya divisualisasi dengan *Discovery Studio*. Visualisasi hasil interaksi berupa gambar 3 Dimensi (3D). Ikatan yang terjadi juga bervariasi. Ikatan kimia terjadi ketika atom dengan kulit valensi tak lengkap dapat berinteraksi dengan atom lain tertentu sedemikian rupa sehingga masing-masing menjadi mempunyai kulit valensi yang lengkap. Atom-atom tersebut menggunakan bersama atau mentransfer elektron valensi. Interaksi ini biasanya mengakibatkan atom-atom menjadi tetap berdekatan, ditahan oleh gaya tarik menarik yang ada, sehingga terjadi interaksi (Campbell dkk., 2010). Protein dapat berinteraksi dengan ligan pada residu asam amino tertentu. Pemahaman bagaimana

komponen makanan berinteraksi sangat penting diketahui untuk mendesain produk makanan (Velickovic & Stanic-Vucinic, 2018).

Hasil visualisasi ikatan yang terjadi antara protein KIT dengan senyawa EGCG setelah *docking* beranekaragam, meliputi ikatan hidrogen, hidrofobik dan elektrostatik (Gambar 6). Namun gambar 2D tidak bisa divisualisasikan dalam interaksi KIT-EGCG. Menurut Velickovic & Stanic-Vucinic, (2018) didalam larutan senyawa polifenol dapat membentuk kompleks non-kovalen dengan protein globular, dan interaksi tersebut dapat mengakibatkan kompleksasi, stabilisasi struktur protein, protein *unfolding* dan *presipitasion*. Kekuatan interaksi bergantung pada ukuran polifenol, struktur polifenol dan urutan asam amino dari protein. Ikatan protein-fenol berinteraksi dengan situs hidrofobik pada protein.

Pada bagian *Non-Bond* terdapat 7 ikatan antara senyawa EGCG dengan protein LOX (Tabel 4). Ikatan ke-1 yaitu ikatan hidrogen tipe *conventional* antara asam amino Thr34 dan LIG1 dengan jarak 2,98, H-donor dari asam amino Thr34 kepada H-*acceptor ligand* dari senyawa EGCG. Ikatan ke-2 yaitu ikatan hidrogen tipe *conventional* antara Asn36 dengan LIG1 dengan jarak 3,08, H-donor dari asam amino Asn36 kepada H-*acceptor ligand* dari senyawa EGCG. Keberadaan satu atau lebih cincin aromatik dan gugus hidroksil dalam struktur kimia senyawa fenolik dapat meningkatkan afinitas pengikatannya pada struktur protein. Jenis interaksi utama yang bertanggung jawab untuk stabilitas kompleks protein-fenolik adalah ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Alu'datt dkk., 2018).

Ikatan ke-3 yaitu ikatan hidrogen tipe *conventional* antara asam amino Arg160 dan LIG1 dengan jarak 2,28, H-donor dari asam amino Arg160 kepada H-*acceptor ligan* senyawa EGCG. Interaksi protein dengan molekul disekitarnya seperti air dan garam menghasilkan pembentukan ikatan hidrogen (Vanga dkk., 2018). Ikatan ke-4 yaitu ikatan hidrogen tipe *conventional* antara asam amino Ile152 dan LIG1 dengan jarak 2,27, H-donor dari ligan senyawa EGCG kepada H-*acceptor* asam amino Ile152. Ikatan hidrogen merupakan salah satu jenis ikatan lemah. Ikatan hidrogen terbentuk ketika atom hidrogen yang berikatan non-kovalen dengan suatu atom elektronegatif juga tertarik ke atom elektronegatif lain. Dalam sel hidup mitra-mitra elektronegatif itu biasanya adalah atom oksigen atau nitrogen (Campbell dkk., 2010).

Ikatan ke-5 yaitu ikatan elektrostatik tipe *Pi-Cation* antara asam amino Arg160 dan LIG1 dengan jarak 4,05, *from chemistry* positif dari asam amino Arg160 kepada *Pi-Orbitals* ligan senyawa EGCG, dengan nilai *Theta* 16,624. Ikatan ke-6 yaitu ikatan elektrostatik tipe *Pi-Anion* antara asam amino Glu101 dan LIG1 dengan jarak 4,88, *from chemistry* negatif dari asam amino Glu101 kepada *Pi-Orbitals* ligan senyawa EGCG, dengan nilai *Theta* 39,745. Ikatan ionik adalah ketika kation dan anion saling tarik menarik. Atom (atau molekul) yang bermuatan disebut ion. Transfer suatu elektron bukanlah pembentukan ikatan, namun hal ini memungkinkan suatu ikatan terbentuk karena transfer tersebut menghasilkan dua ion. Dua ion apapun yang memiliki muatan berlawanan dapat membentuk ikatan ionik. Ion-ion itu tidak harus memperoleh muatannya melalui transfer elektron satu sama lain. Senyawa yang terbentuk oleh ikatan ionik disebut senyawa ionik (Campbell dkk., 2010).

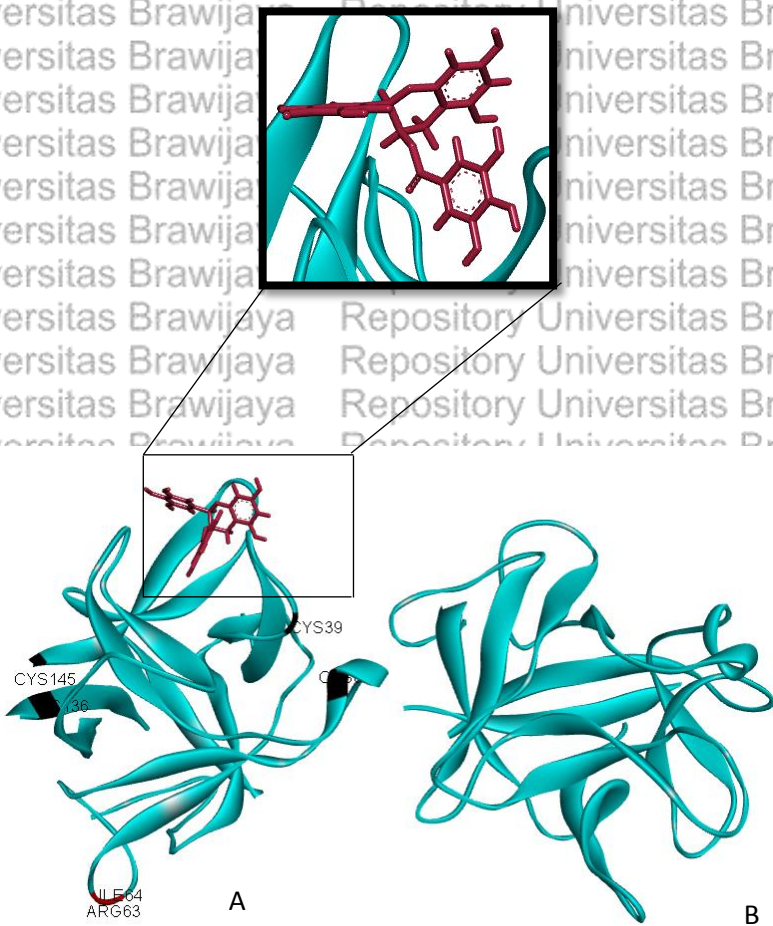
Ikatan ke-7 yaitu ikatan hidrofobik tipe *Pi-Pi T-Shaped* antara LIG1 dan LIG1 dengan jarak 5,84, *from chemistry Pi-Orbitals* dari asam amino Glu101 kepada *Pi-Orbitals* LIG1 senyawa EGCG, dengan nilai *Theta* 25,38, *Theta* 2 68,702, dan *Gamma* 75,137. Pada bagian *Unfavorable Non-Bond* hanya terdapat satu ikatan antara asam amino Arg160 dengan LIG1, dengan jarak 2,22 dan tipe *Unfavorable Bump; Carbon Hydrogen Bond* dari Steric; H-Donor asam amino Arg160 kepada Steric; H-Acceptor LIG1. Pada organisme, sebagian besar ikatan kimia terkuat adalah ikatan kovalen, yang menautkan atom-atom untuk membentuk molekul-molekul sel. Namun ikatan yang lebih lemah diantara molekul juga sangat penting karena berperan sangat besar bagi sifat emergen kehidupan. Molekul-molekul biologis besar yang paling penting dapat dipertahankan dalam bentuk fungsional oleh ikatan lemah (Campbell dkk., 2010).

Ikatan lemah memiliki kemampuan untuk kembali pada kondisi semula atau biasa disebut reversibilitas yang dapat menguntungkan ketika dua molekul dapat bergabung, karena dapat memberikan respons satu sama lain, dan kemudian berpisah (Campbell dkk., 2010). Dalam interaksi reversibel, ikatan yang terjadi biasanya seperti ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, gaya *Van der Waals* dan ikatan ionik (ikatan ionik terjadi karena adanya ikatan ion-ion yang terdisosiasi dalam air). Sedangkan dalam interaksi reversibel yang terbentuk antara polifenol dan protein adalah ikatan kovalen. Polifenol dapat mengikat baik pada bagian hidrofobik atau hidrofilik tergantung pada

situs pengikatan protein (Ozidal dkk., 2013). Pada hasil penelitian ini interaksi antara senyawa EGCG dengan protein KIT membentuk ikatan hidrogen, elektrostatik dan hidrofobik sehingga dapat dikategorikan dalam larutan yang berkondisi reversibel.

Ikatan hidrogen, ikatan ionik, dan jembatan disulfida akan mempertahankan bentuk protein. Namun agen-agen denaturasi seperti perlakuan kimia akan mengganggu ikatan tersebut dan menyebabkan protein terdenaturasi. Protein yang terdenaturasi secara biologis bersifat *inactive*. Denaturasi juga dapat terjadi akibat panas yang berlebih karena cukup mengacaukan rantai polipeptida, sehingga interaksi-interaksi lemah yang menstabilkan strukturpun kalah. Sekuens asam amino menentukan bentuk protein dimana α -heliks dan juga β -sheet dapat terbentuk, jembatan disulfida terletak dan ikatan ionik dapat terbentuk (Campbell dkk., 2010). Interaksi kovalen dan non-kovalen dapat menyebabkan pengendapan protein melalui interaksi multisite atau multidentat. Dalam interaksi multisite beberapa fenolat mengikat satu molekul protein dan dalam interaksi multidentat satu fenolik berikatan dengan beberapa situs protein (Ozidal dkk., 2013) dan hasil *docking in silico* pada kompleks KIT-EGCG menunjukkan bahwa adanya pengendapan larutan yaitu interaksi multisite karena LIG1 dari struktur 3D senyawa EGCG dapat berikatan dengan 5 residu asam amino berbeda (Thr34, Asn36, Arg160, Ile152, dan Glu101) pada struktur protein KIT.

Protein memiliki sisi aktif atau *binding site* untuk mengaktifkan fungsinya. Namun pada hasil *docking in silico* ini senyawa EGCG tidak berikatan pada sisi aktif protein KIT (Asp1, Asn13, Pro60, Ser61, Tyr62, Arg63, Ile64, Arg65, dan His71) ataupun ikatan disulfida (Cys39-Cys86 dan Cys136-Cys145) melainkan berikatan dengan asam amino Thr34, Asn36, Arg160, Ile152, dan Glu101 (Gambar 7), sehingga aktivitas serine protease (protein *kunitz inhibitor trypsin / KIT*) ini tidak bisa dihentikan oleh senyawa polifenol secara langsung. Menurut Campbell dkk., (2010) inhibitor suatu enzim dapat menurunkan fungsi optimal enzim tersebut dan protein KIT masuk dalam kompetitif inhibitor (Carbrera-Orozco & Davila-Ortiz, 2010). Mekanisme kompetitif inhibitor ini yaitu ketika inhibitor protease berikatan dengan situs aktif suatu enzim yang seharusnya tempat substrat berikatan. Namun LIG1 (senyawa EGCG) tidak berikatan dengan atau ikatan disulfida protein KIT.



Gambar 9. Interaksi Struktur 3D antara Protein KIT dengan Senyawa EGCG.

Keterangan :

Biru : Struktur 3D Protein KIT

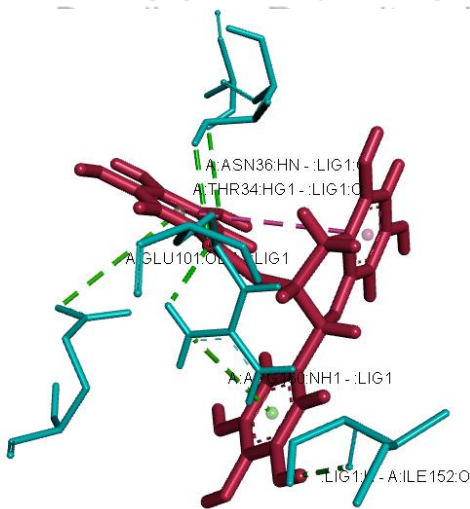
Merah : Active Site protein KIT

Hitam : Disulfida bridge pada protein KIT

A : Subdomain A

B : Subdomain B

Merah Tua : Struktur 3D senyawa EGCG



Gambar 10. Struktur 3D *Ligand Interaction* antara protein KIT dengan Senyawa EGCG.

Keterangan :

Biru : Protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT)

Merah : Senyawa Epigallocatechin gallate (EGCG)

4.5 Analisis Interaksi Protein LOX dengan Senyawa EGCG

Hasil visualisasi docking dengan *Discovery Studio* antara struktur 3D protein LOX dengan struktur 3D senyawa EGCG menghasilkan ikatan-ikatan dengan melibatkan beberapa asam amino (Gambar 8). Residu asam amino yang terlibat dalam interaksi LOX dengan EGCG meliputi Asn370, Ile412, Asp408, Asp411, Ile412. Pada kompleks EGCG-LOX menunjukkan bahwa adanya pengendapan larutan dalam interaksi multisite karena LIG1 dari struktur 3D senyawa EGCG dapat berikatan dengan 5 residu asam amino berbeda (Asn370, Ile412, Asp408, Asp411, dan Ile412) pada struktur model 3D protein LOX (Gambar 9). Ikatan yang terjadi pada interaksi antara struktur model protein LOX dengan struktur 3D senyawa EGCG terdapat 7 ikatan (Tabel5). Ikatan ke-1 yaitu ikatan hidrogen antara asam amino Asn370 dan LIG1 dengan jarak 2,73, tipenya *Conventional Hydrogen Bond*. *From Chemistry* H-Donor berasal dari asam amino Asn370 terhadap H-Acceptor LIG1. Ikatan hidrogen, interaksi *van der Waals*, ikatan ionik dalam air, dan ikatan lemah yang lain dapat terbentuk tidak

hanya diantara molekul-molekul namun juga diantara wilayah-wilayah berbeda dari satu molekul tunggal yang berukuran besar seperti protein. Walaupun secara individual, efek kumulatif yang dihasilkan yaitu untuk mempertahankan bentuk tiga dimensi pada molekul ukuran besar seperti protein (Campbell dkk., 2010).

Ikatan ke-2 yaitu ikatan hidrogen antara LIG1 dan asam amino Ile412 dengan jarak 2,96, dan tipenya *Conventional Hydrogen Bond. From Chemistry H-Donor* berasal dari LIG terhadap H-Acceptor asam amino Ile412. Asam fenolik dengan mudah membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan ikatan karbonil amida dari tulang punggung peptida. Jumlah gugus hidroksil pada jumlah cincin aromatik asam fenolik menentukan afinitas terhadap protein kedelai (Gan dkk., 2016). Gugus fenolik adalah donor hidrogen yang sangat baik dan dapat membentuk ikatan hidrogen dengan gugus karboksil protein. Senyawa fenolik yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap protein harus cukup kecil untuk menembus daerah-daerah antar *fibrillar* dari molekul protein, tetapi cukup besar untuk menghubungkan rantai peptida pada lebih dari satu titik (Ozdam dkk., 2013).

Ikatan ke-3 yaitu ikatan hidrogen antara LIG1 dan asam amino Asp408:OD2 dengan jarak 2,25, dan tipenya *Conventional Hydrogen Bond. From Chemistry H-Donor* berasal dari LIG terhadap H-Acceptor asam amino Asp408:OD2. Kemampuan protein untuk berinteraksi dengan fenolik melalui ikatan hidrogen adalah karena beberapa faktor termasuk kehadiran gugus hidroksil dalam struktur utama fenolik dan gugus karbonil dalam hubungan peptida protein (Alu'datt dkk., 2018). Ikatan ke-4 yaitu ikatan hidrogen antara LIG1 dan asam amino Asp408:OD2:B dengan jarak 2,43, dan tipenya *Conventional Hydrogen Bond. From Chemistry H-Donor* berasal dari LIG1 terhadap H-Acceptor asam amino Asp408:OD2:B.

Ikatan ke-5 yaitu ikatan elektrostatik antara asam amino Asp411 dan LIG1 dengan jarak 4,35, dan tipenya *Pi-Anion. From Chemistry* negatif berasal dari asam amino Asp411 terhadap *Pi-Orbitals* LIG1, nilai *Theta2* sebesar 15,841. Ikatan ke-6 yaitu ikatan hidrofobik antara LIG1 dan LIG1, dengan jarak 5,84, dan tipenya *Pi-Pi T-Shaped. From Chemistry Pi-Orbitals* berasal dari LIG1 terhadap *Pi-Orbitals* LIG1, nilai *Theta2* sebesar 25,385, *Gamma* 75,152 dan *Closest Atom Distance* 4,23. Ikatan ke-7 yaitu ikatan hidrofobik antara LIG1 dan asam amino ILE412, dengan jarak 5,05, dan tipenya *Pi-Alkyl. From*

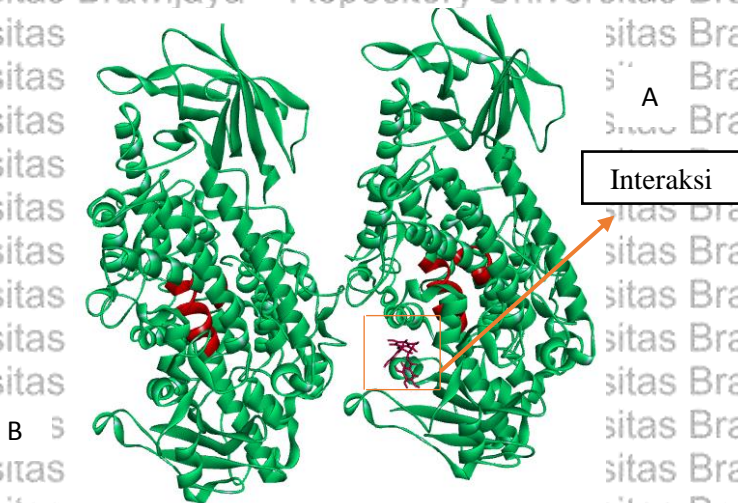
Chemistry berasal dari *Pi-Orbitals* LIG1 terhadap *Alkyl* asam amino Ile412. Menurut Chen dkk., (2019) ikatan antara polifenol teh dengan protein biasanya ikatan hidrofobik dan hidrofilik. Kompleks fenolik-protein dapat juga terbentuk melalui interaksi hidrofobik. Kemampuan protein untuk berinteraksi dengan fenolik melalui ikatan hidrogen yaitu karena beberapa faktor termasuk kehadiran gugus hidroksil dalam struktur utama fenolik dan gugus karbonil dalam polipeptida protein (Alu'datt dkk., 2018).

Pada bagian *Unfavorable Non-Bond* terdapat dua ikatan, ikatan ke-1 antara asam amino Asn370:ND2 dan LIG1:O dengan jarak 2,08, *category unfavorable, types Unfavorable Bump, Steric* dari asam amino Asn370:ND2:B terhadap *Steric* LIG1. Ikatan ke-2 antara asam amino Asn370:HD21:B dan LIG1:O dengan jarak 1,40, *category unfavorable, types (Unfavorable Bump), Steric* dari asam amino Asn370:ND2:B terhadap *Steric* LIG1. Pada bagian *Unsatisfied Non-Bond* Atom O LIG1 sebagai *acceptor* sedangkan atom H sebagai *donor*. Jenis-jenis ikatan kimia terkuat adalah ikatan kovalen dan ionik. Ikatan kovalen dapat terjadi karena ada penggunaan bersama sepasang elektron valensi oleh dua atom. Dua atau lebih atom yang disatukan oleh ikatan kovalen membentuk suatu molekul. Satu ikatan kovalen tunggal disebut ikatan tunggal. Ketika dua pasang elektron valensi menggunakan secara bersama-sama maka disebut ikatan ganda. Setiap atom yang berbagi elektron valensi memiliki kapasitas pengikatan yang sesuai dengan jumlah ikatan kovalen yang dapat dibentuk oleh atom ini. Ketika ikatan tersebut terbentuk, elektron pada kulit valensipun menjadi lengkap (Campbell dkk., 2010).

Pemahaman tentang interaksi antara polifenol teh dan protein kedelai dapat memelihara serta meningkatkan sifat-sifat protein. Penambahan polifenol teh dapat mengubah profil protein kedelai seperti berat molekul yang juga sering dikaitkan dengan ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik (Chen dkk., 2019). Protein kedelai mampu membentuk kompleks dengan komponen makanan lainnya termasuk polifenol yang dapat menyebabkan perubahan sifat struktural, fungsional dan nutrisi protein. Dasar pemahaman perubahan ini penting untuk perkembangan ilmiah, industri, dan ekonomi (Ozidal dkk., 2013). Senyawa polifenol tumbuhan menunjukkan interaksi yang kuat dengan protein globular dan dapat menyebabkan protein *unfolding*. Afinitas ikatan polifenol terhadap protein bergantung pada ukuran. Polifenol yang lebih besar memiliki

peluang kemungkinan lebih besar untuk membentuk kompleks dengan protein. Ikatan ini dapat mempengaruhi kapasitas perpindahan elektron pada polifenol dengan mengurangi jumlah gugus hidroksil yang tersedia dalam larutan (Hasni dkk., 2011).

Interaksi protein dengan senyawa fenolik juga dapat meningkatkan stabilitas termal protein dan meningkatkan kapasitas antioksidan, seperti yang dilakukan pada kacang polong setelah diinteraksikan dengan senyawa fenolik (Ozidal dkk., 2013). Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi interaksi protein-fenolik seperti berat molekul, metilasi, hidroksilasi, glikosilasi, dehidrogenasi senyawa fenolik. Katekin merupakan senyawa fenolik dengan berat molekul rendah diantara ada katekin (Ozidal dkk., 2013). Meskipun banyak perlakuan yang dilakukan. Struktur sekunder protein kedelai tetap bisa dipertahankan karena adanya ikatan disulfida (Vanga dkk., 2018). Residu triptofan juga penting dalam memelihara stabilitas protein kedelai. Molekul protein kedelai tetap stabil terhadap kenaikan suhu karena adanya ikatan disulfida dan adanya konformasi β -Sheet (Vanga dkk., 2018).

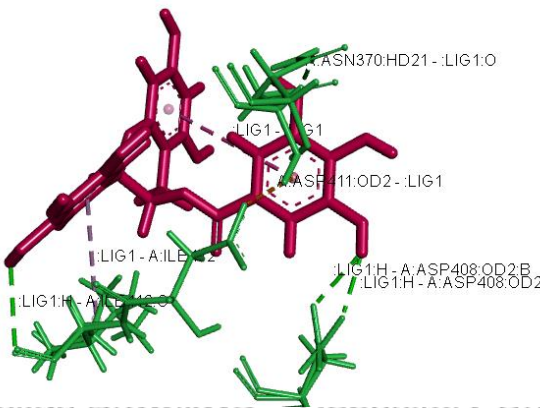
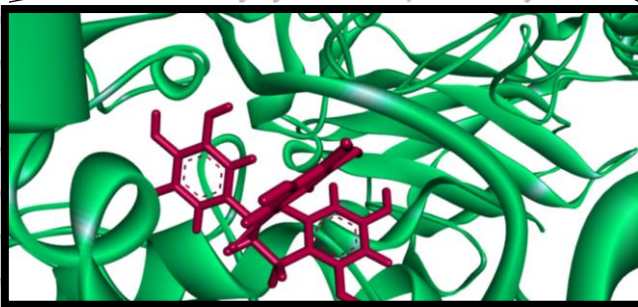
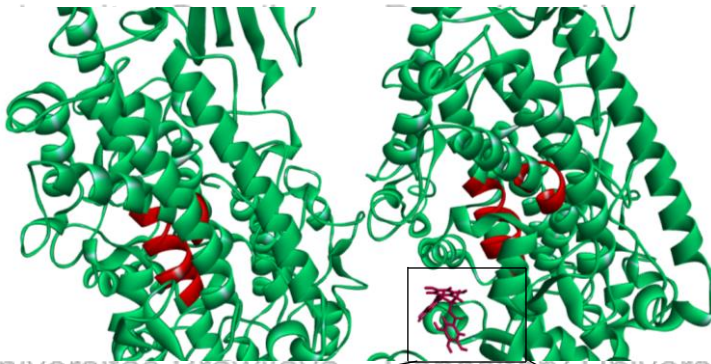


Gambar 11. Interaksi Struktur 3D antara Protein LOX dengan EGCG.

Keterangan :

Hijau : Protein *Lipoxygenase* (LOX)

Merah : Senyawa Aktif Protein *Lipoxygenase* LOX



Gambar 12. Struktur 3D *Ligand Interaction* antara Protein LOX dengan Senyawa EGCG.

Keterangan Gambar :

Hijau : Struktur 3D Protein LOX

Merah : *Active Site Amino Acid* pada protein LOX

A : Subdomain A

B : Subdomain B

Merah Tua : Struktur 3D senyawa EGCG



Tabel 2 . Interaksi antara protein *Kunitz Inhibitor Trypsin* (KIT) dengan Senyawa EGCG

Protein	Ligan	Nama	Jarak Ikatan	Kategori	Tipe	
<i>Kunitz Inhibitor Trypsin</i> (KIT)	EGCG (Epigallocatechin gallate)	A:Thr34:HG1 -: LIG1 :O	2,98725	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>	
		A:Asn36:HN -: LIG1 :O	3,08053	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>	
		A:Arg160:HH12 -: LIG1 :O	2,28963	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>	
		:LIG1:H	2,27132	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>	
		A: Ile152 :O				<i>Pi-Cation</i>
		A:Arg160:NH1 -: LIG1	4,0549	<i>Electrostatic</i>	<i>Pi-Anion</i>	
		A:Glu101:OE2 -: LIG1	4,88841	<i>Electrostatic</i>	<i>Pi-Pi T-shaped</i>	
		:LIG1 - :LIG1	5,84377	<i>Hydrophobic</i>		

Keterangan: **Bold** adalah aseptor



Protein	Ligan	From	Form Chemistry	To	To Chemistry
<i>Kunitz Inhibitor</i> <i>Trypsin</i> (KIT)	EGCG (Epigallocatechin gallate)	A:Thr34:HG1	<i>H-Donor</i>	<i>H-Acceptor</i>	<i>H-Acceptor</i>
		A:Asn36:HN	<i>H-Donor</i>	<i>H-Acceptor</i>	<i>H-Acceptor</i>
		A:Arg160:HH12	<i>H-Donor</i>	<i>H-Acceptor</i>	<i>H-Acceptor</i>
		:LIG1:H	<i>H-Donor</i>	<i>H-Acceptor</i>	<i>H-Acceptor</i>
		A:Arg160:NH1	<i>Positive</i>	<i>Pi-Orbitals</i>	<i>Pi-Orbitals</i>
		A:Glu101:OE2	<i>Negative</i>	<i>Pi-Orbitals</i>	<i>Pi-Orbitals</i>
		:LIG1	<i>Pi-Orbitals</i>	<i>Pi-Orbitals</i>	<i>Pi-Orbitals</i>

Tabel 3. Interaksi antara protein *Lipoxygenase* (LOX) dengan senyawa EGCG

Protein	Ligan	Nama	Jarak Ikatan	Kategori	Tipe
<i>Lipoxygenase</i> (LOX)	EGCG (Epigallocatechin gallate)	A:Asn370:HD21 - :LIG1:O	2,73336	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>
		:LIG1:H - A:Ile412:O	2,96977	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>
		:LIG1:H - A:Asp408:OD2	2,25399	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>
		:LIG1:H - A:Asp408:OD2:B	2,43107	<i>Hydrogen Bond</i>	<i>Conventional Hydrogen Bond</i>
		A:Asp411:OD2 - :LIG1	4,35027	<i>Electrostatic</i>	<i>Pi-Anion</i>
		:LIG1 - :LIG1	5,8437	<i>Hydrophobic</i>	<i>Pi-Pi T-shaped</i>
		:LIG1 - A:Ile412	5,05641	<i>Hydrophobic</i>	<i>Pi-Alkyl</i>

Keterangan: **Bold** adalah aseptor.



<i>Protein</i>	<i>Ligan</i>	<i>From</i>	<i>Form Chemistry</i>	<i>To</i>	<i>To Chemistry</i>
<i>Lipoxygenase (LOX)</i>	EGCG (Epigallocatechin gallate)	A:Asn370:HD21	<i>H-Donor</i>	:LIG1:O	<i>H-Acceptor</i>
		:LIG1:H	<i>H-Donor</i>	A:Ile412:O	<i>H-Acceptor</i>
		:LIG1:H	<i>H-Donor</i>	A:Asp408:OD2	<i>H-Acceptor</i>
		:LIG1:H	<i>H-Donor</i>	A:Asp408:OD2;B	<i>H-Acceptor</i>
		A:Asp411:OD2	<i>Negative</i>	:LIG1	<i>Pi-Orbitals</i>
		:LIG1	<i>Pi-Orbitals</i>	:LIG1	<i>Pi-Orbitals</i>
		:LIG1	<i>Pi-Orbitals</i>	A:Ile412	<i>Alkyl</i>

4.6 *Binding Energy* Interaksi Protein KIT dan LOX dengan Senyawa EGCG

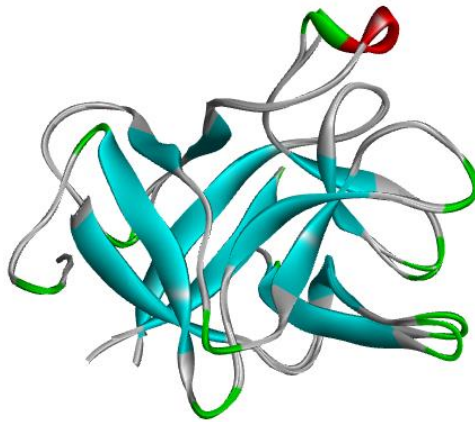
Salah satu tujuan proses *docking* molekuler yaitu untuk menemukan konformasi yang optimal antara ligan (L) dengan reseptor (R) yang menghasilkan energi ikat minimum (Garcia-Nieto dkk., 2019). Energi total yang dihasilkan dari *docking* menggunakan aplikasi *Hex* antara struktur 3D protein KIT dengan struktur 3D senyawa EGCG yaitu sebesar -238,77, sedangkan *energy binding* total yang didapatkan antara struktur 3D protein LOX dengan struktur 3D senyawa EGCG sebesar -309,86. Ikatan kuat atau tidak mudah balik diharapkan dari pembuatan produk campuran susu tempe dan teh ini. Hal tersebut dikarenakan adanya ikatan yang kuat antara protein *antinutrients* dengan senyawa EGCG lebih berpotensi untuk menginaktivkan protein *antinutrients*. Semakin besar nilai *binding energy* maka ikatan yang dihasilkan semakin kuat atau tidak mudah balik. Senyawa alami yaitu substrat dari enzim KIT yaitu tripsin dan enzim LOX meliputi asam linoleat dapat dijadikan kontrol positif sebagai pembanding untuk mengetahui lebih cepat senyawa alaminya yang berikatan atau protein KIT dan LOX dilihat dari *binding energy*-nya. Nilai *binding energy* yang dihasilkan dari kompleks dengan substrat alaminya menunjukkan jika energi yang dihasilkan tinggi sehingga ikatan tersebut tidak mudah balik.

Ikatan yang lebih kuat menyebabkan penghambatan tinggi terhadap protein kedelai (Zhang dkk., 2019). Energi ikatan yang diprediksi dan sifat interaksi yang diduga, menunjukkan adanya situs pengikatan EGCG yang berafinitas tinggi yang terletak dicelah antara α -heliks dan β -sheet (Al-Hanish dkk., 2016). Menurut Chedea & Jisaka, (2011) makanan fungsional tidak pernah berdiri sendiri dari bahan tunggal, biasanya merupakan campuran dari banyak bahan dalam proporsi yang tepat.

4.7 Hasil Visualisasi *Super Impose* Kompleks KIT-(KIT-EGCG)

Super Impose dilakukan secara *online* dengan aplikasi *SuperPose Version 1.0* antara struktur 3D protein KIT sebelum *didocking* dengan kompleks KIT-EGCG setelah *didocking*. Hasil visualisasi *Super Impose* kompleks KIT-(KIT-EGCG) dengan aplikasi *Discovery Studio* menunjukkan jika tidak ada perubahan struktur 3D protein KIT sebelum dan setelah *didocking* dengan senyawa EGCG karena tidak

ada pergeseran dari kedua struktur 3D ketika disatukan (*Super Impose*) (Gambar 10). Hasil aplikasi *SuperPose Version 1.0* yang dilakukan secara *online* juga menunjukkan hal yang sama ketika kedua struktur 3D KIT dan KIT-EGCG disejajarkan pada bagian *MolScript Superposition Image* (Gambar 11).



Gambar 13. *Super Impose* Protein KIT dengan Kompleks KIT-EGCG.



Gambar 14. *MolScript Superposition Image* Protein KIT dengan Kompleks KIT-EGCG.

4.8 Hasil Visualisasi *Super Impose* Kompleks LOX-(LOX-EGCG)

Hasil visualisasi *Super Impose* kompleks LOX-(LOX-EGCG) dengan aplikasi *Discovery Studio* menunjukkan tidak adanya perubahan struktur 3D pada kompleks LOX-EGCG yang telah *didocking* (Gambar 12). Hasil aplikasi *SuperPose Version 1.0* bagian *MolScript Superposition Image* yang dilakukan secara *online* menunjukkan hal yang sama ketika kedua struktur 3D LOX dan kompleks LOX-EGCG disejajarkan (Gambar 13).

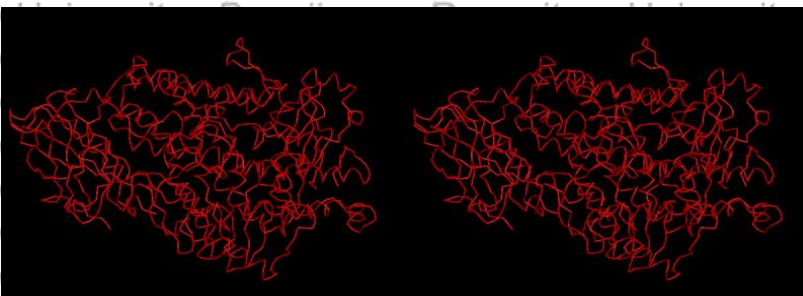


Gambar 15. *Super Impose* Protein LOX dengan Kompleks LOX-EGCG.

Keterangan :

Merah : Struktur sekunder α -helix

Biru : Struktur sekunder β -sheet



Gambar 16. *MolScript Superposition Image* Protein LOX dengan Kompleks LOX-EGCG

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Interaksi yang terjadi antara senyawa EGCG (ligan) dengan protein KIT dan LOX (reseptor) menghasilkan ikatan-ikatan pada beberapa residu asam amino protein. Interaksi antara LIG1 dengan protein KIT terjadi pada residu asam amino Thr34, Asn36, Arg160, Ile152, dan Glu101, sedangkan untuk residu asam amino protein LOX meliputi Asn370, Ile412, Asp408, Asp411, dan Ile412. Penghambatan senyawa EGCG terhadap protein KIT dan LOX pada kedelai kurang optimal karena LIG1 tidak berikatan pada *active site* dan ikatan disulfida dari protein KIT atau *active site* pada protein LOX seperti yang diharapkan, melainkan pada residu asam amino yang lain. Diduga akan terjadi endapan dalam interaksi *multisite* pada produk susu tempe. Jenis ikatan yang dihasilkan didominasi oleh ikatan lemah seperti ikatan hidrogen, ikatan elektrostatik dan ikatan hidrofobik dan diduga interaksi yang dihasilkan memiliki kemampuan kembali pada kondisi semula (*reversible*). Energi total *binding* yang didapatkan lebih kecil kompleks LOX-EGCG dari pada KIT-EGCG. Ketika dilakukan analisa *Super Impose* tidak ada perubahan struktur 3D pada kompleks KIT-EGCG maupun LOX-EGCG yang telah *didocking* dengan aplikasi *online SuperPose Version 1.0*

5.2 Saran

Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mengembangkan produk susu tempe kedepannya, masih perlu penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan bahan tambahan yang cocok untuk mengatasi bau dan rasa langu dalam olahan susu tempe. Selain itu perlu penelitian lanjutan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, penelitian organoleptik. Melakukan *docking* antara setiap protein dan substrat alaminya untuk membandingkan nilai *binding energynya* dengan hasil *docking* menggunakan senyawa pilihan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, K. & D. W. Asriati. 2016. Karakteristik Minuman Sari Tempe dengan Penambahan Rasa Vanila. *Journal of Agro-based Industry*. 33(1):1-8.
- Aiello, G., S. Ferruzza., G. Ranaldi., Y. Sambuy., A. Arnoldi., G. Vistoli. & C. Lammi. 2018. Behavior of three hypocholesterolemic peptides from soy protein in an intestinal model based on differentiated Caco-2 cell. *Journal of Functional Foods*. 45:363–370.
- Alghamdi, S. S., M. A. Khan., E. H. El-Harty., M. H. Ammar., M. F. & H. M. Migdadi. 2018. Comparative phytochemical profiling of different soybean (*Glycine max* (L.) Merr) genotypes using GC-MS. *Saudi Journal of Biological Sciences* .25:15–21.
- Al-Hanish, A., D. Stanic-Vucinic., J. Mihailovic., I. Prodic., S. Minic., M. Stojadinovic., M. Radibratovic., M. Milcic., T. & C. Velickovic. 2016. Noncovalent interactions of bovine a-lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocolloids*. 61:241-250.
- Alu'datt, M. H., T. Rababah., M. N. Alhamad., M. A. Al-Mahasneh., S. Gammoh., M. Al-Duais., C. C. Tranchant., S. Kubow. & I. Alli. 2018. Protein-Lipid-Phenolic Interaction During Soybean and Flaxseed Protein Isolation. *Encyclopedia of food chemistry*. 621-632.
- Bauer, R. A., P. E. Bourne., A. Formella., C. F. Mmel., C. Gille., A. Goede., A. Guerler., A. Hoppe., Ernst-Walter Knapp., T. P. Schel., B. Wittig., V. Ziegler., & R. Preissner. 2008. Superimpose 3: a 3D structural superposition server. *Nucleic Acids Research*. (36):47–54.
- Bose, A. 2016. Interaction of tea polyphenols with serum albumins: A fluorescence spectroscopic analysis. *Journal of Luminescence*. 169:220–226.
- Campbell, N. A., J. B. Reece., L. A. Urry., M. L. Cain., S. A. Wasserman., P. V. Minorsky., & R. B. Jackson. 2010. **BIOLOGI Edisi Kedelapan Jilid**. Erlangga. Jakarta.
- Carbrera-Orozco, C, J-M., & G. Davila-Ortiz. 2010. **Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological Functional. Soybean Bio-Active Compounds**. National Polytechnic Institute, Mexico.

- Chan, Y-C., I-T. Lee., M-F. Wang., W-C. Yeh. & B-C. Liang. 2018. Tempeh attenuates cognitive deficit, antioxidant imbalance, and amyloid β of senescence-accelerated mice by modulating Nrf2 expression via MAPK pathway. *Journal of Functional Foods*.50:112–119.
- Chedea, V. S. & M. Jisaka. 2011. Enhancing the Diversity and Quality of Soybean products (6 Inhibitor of Soybean Lipoxygenase Structural and Activity Models for the Lipoxygenase Isoenzymes Family). *Recent Trends for Enhancing the Diversity and Quality of Soybean Products*. 110-130.
- Chen, G., S. B. Feng., B. Jiang., & M. Niao. 2019. Interaction between soybean protein and tea polyphenols under high pressure. *Food Chemistry*. (273):632-638.
- Desphande, S. S. 2002. **Handbook of food toxicology**. Marcel Dekker Inc. New York.
- Eslami O. & F. Shidfar. 2019. Soy milk: A functional beverage with hypocholesterolemic effects? A systematic review of randomized controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*. 42:82–88.
- Fang, Z., & B. Bhandari. 2010. Encapsulation of polyphenols a review. *Trends in Food Science & Technology*. 21:510-523.
- Fatchiyah. 2015. **Prinsip Dasar Bioinformatika**. Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Feraason, E., L. Quillien, & J. Gueguen. 1997. Protease inhibitor from pea seed: purification and characterization. *J. Agric. Food Chem*. 45:127-131.
- Frokier, H., T. M. R. Jorgensen., A. Rosendal , M.C. Tonsgaard. & V. Barkholt. 1997. **Antinutritional and allergenic proteins**. American Chemical Society. Washington DC.
- Gan, J., H. Chen., J. Liu., Y. Wang., S. Nirasawa., & Y. Cheng. 2016. Interaction of β -Conglycinin (7S) with Different Phenolic Acids-Impact on Structural Characteristics and Proteolytic Degradation of Proteins. *International Journal of Molecular Science*. 17:1671.
- García-Nieto, J., E. López-Camacho., M. J. García-Godoy., A. J. Nebro., & J. F. Aldana-Montes. 2019. Multi-objective ligand protein docking with particle swarm optimizers. *Swarm and Evolutionary Computation* .44:439–452.

- Gemede, H. F. & N. Ratta. 2014. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 3(4):284-289.
- Green, R. J., A. S. Murphy., B. Schulz., B. A. Watkins. & M. G. Ferruzzi. 2007. Common tea formulations modulate in vitro digestive recovery of green tea catechins. *Mol. Nutr. Food Res*. 51:1152 – 1162.
- Guixer, Bernat., M. B. Frost. & R. Flore. 2017. Tempeto – Expanding the scope and culinary applications of tempe with post-fermentation sousvide cooking. *International Journal of Gastronomy and Food Science*. 1-9.
- Haidar, C. N., E. Coscueta., E. Cordisco., B. B. Nerli. & L. P. Malpiedi. 2018. Aqueous micellar two-phase system as an alternative method to selectively remove soy antinutritional factors. *LWT-Food Science and Technology*. 93:665–672.
- Hasni, I., P. Bourassa., S. Hamdani., G. Samson., R. Carpentier. & H. A. Tajmir-Riahi. 2011. Interaction of milk a- and b-caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*. 126:630–639.
- Jauhari, M., A. Sulaeman., H. Riyadi. & I. Ekayanti. 2014. Pengembangan Formula Minuman Olahraga Berbasis Tempe Untuk Pemulihan Kerusakan Otot. *Jurnal Agritech*. 34(3).
- Junghans, T. G., M. G. d. A. Oliveira. & M. A. Moreira. 2004. Atividade de lipoxigenases durante o desenvolvimento da raiz e do nódulo de plantas de soja. *Pesq. agropec. bras., Brasília*. 9(7):625-630.
- Kanetro, B., Z. Noor., Sutardi, & R. Indrati. 2002. Karakteristik Trypsin Inhibitor dan Penjajagan sebagai Komponen Makanan Fungsional Penderita Diabetes (IIDM). *Agritech*. 25:186-194.
- Kim, S., P. A. Thiessen., E. E. Bolton., J. Chen., G. Fu., A. Gindulyte., L. Han., J. He., S. He., B. A. Shoemaker., J. Wang., B. Yu., J. Zhang. & S. H. Bryant. 2015. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*. (2).
- Kim, S., P. A. Thiessen., T. Cheng., B. Yu., B. A. Shoemaker., J. Wang., E. E. Bolton., Y. Wang., & S. H. Bryant. 2016. Literature information in PubChem: associations between PubChem records and scientific articles. *J Cheminform*. 8:32.

- Lasekan, O. & A. Lasekan. 2012. Flavour chemistry of mate and some common herbal teas. *Trends in Food Science & Technology*. 27:37-46.
- Lee, C. C., S. Dudonné., P. Dubé., Y. Desjardins., J. H. Kim., J. S. Kim., J-E. Kim., J. H. Y. Park., K. W. Lee., & C. Y. Lee. 2017. Comprehensive phenolic composition analysis and evaluation of Yak-Kong soybean (*Glycine max*) for the prevention of atherosclerosis. *Food Chemistry*. 234:486–493.
- Li, J., Q. Xiang X. Liu T. Ding., X. Zhang., Y. Zhai. & Y. Bai. 2017. Inactivation of soybean trypsin inhibitor by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma. *Food Chemistry*, 232:515-522.
- Liliana, R. A., C. Cyril., C-M. Julio., & G.C. Fernando. 2019. The protease-based compensatory mechanism to minimize the effect of dietary Soybean Trypsin Inhibitor in *Litopenaeus vannamei*. *Aquacultur*. 500:18-23.
- Liu, K. 1999. **Soybeans: Chemistry, technology, and utilization**. Aspen Publ. Gaithersburg. Maryland.
- Magrone, T., & E. Jirillo. 2018. Effects of Polyphenols on Inflammatory-Allergic Conditions: Experimental and Clinical Evidences. *Inflammation and immune function: polyphenols*. 253-259
- Martinsingsih, M. Atik, M. N. Hastuti, & Subiyono. 2010. *Pengaruh Hepatoprotektor Seduhan Teh Hijau (Camelia sinensis L.) Terhadap Aktivitas Gamma Glutamyl Transferase (GGT) pada Rattus Novergicus yang Diinduksi Karbon Tetraklorida*. 1-5.
- Mo, H., S. Kariluoto., V. Piironen., Y. Zhu., M. G. Sanders., J-P. Vincken., J. Wolkers-Rooijackers., & M.J. R. Nout. 2013. Effect of soybean processing on content and bioaccessibility of folate, vitamin B12 and isoflavones in tofu and tempe. *Food Chemistry*. 141:2418–2425.
- Moumita, S., B. Das., A. Sundaray, S. Satpathi., P. Thangaraj., S. Marimuthu., & R. Jayabalan. 2018. Study of soy-fortified green tea curd formulated using potential hypocholesterolemic and hypotensive probiotics isolated from locally made curd. *Food Chemistry*. 268:558–566.
- Murray R. K., D. A. Bender., K. M. Botham., P. J. Kennelly., V. W., Rodwell. & P. A. Weil. 2012. Biokimia Harper. Edisi 29. **Buku Kedokteran EGC**. Jakarta.

- Nelson, M. J., & S. P. Seitz. 1994. The structure and function of lipoxygenase. *Current Opinion in Structural Biology*. 4:878-884.
- Nourieh, Z., S. A. Keshavarz., M. J. H. Atta. & L. Azadbakht. 2012. Effects of soy milk consumption on inflammatory markers and lipid profiles among non-menopausal overweight and obese female adults. *Journal of Research in Medical Sciences*. (1):65-71.
- Oyediji, A. B., J. J. Mellem. & O. A Aljabadeniyi. 2018. Potential For enhanced soy storage protein breakdown and allergen reduction in soy-based foods produced with. *LWT*. 98:540-545.
- Ozdal, T., E. Capanoglu. & F. Altay. 2013. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*. 51:954-970.
- Peñalvo, J. L., T Nurmi. & H. Adlercreutz. 2004. A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products. *Food Chemistry*. 87(2):297-305.
- Preece, K. E., N. Hooshyar. & N. J. Zuidam. 2017. Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 43:163-172.
- Rawel, H. M., D. r. Czajka., S. Rohn., & J. r. Kroll. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*. 30:137-150.
- Razie, F., & L. Widawati. 2018. Kombinasi Pengemasan Vakum dan ketebalan Kemasan untuk Memperpanjang Umur Simpan Tempe. *Agritepa*. 4(2):94-107.
- Reseland, J. E., H. Holm., M. B Jacobsen., T. G. Jenssen. & L. E. Hanssen. 1996. Protease inhibitor induced selective stimulation of human trypsin and chymotrypsin secretion. *J. Nutr*. 126:634-642.
- Roubos-van den Hil, P. J., M.J. R. Nout., J. v. D. Meulen., & H. Gruppen. 2010. Bioactivity of tempe by inhibiting adhesion of ETEC to intestinal cells, as influenced by fermentation substrates and starter pure cultures. *Food Microbiology*. 27:638-644.
- Silva, F., L. Torres., L. Silva., R. Figueiredo., D. Garruti., T. Araújo., A. Duarte., D. Brito. & N. Ricardo. 2018. Cashew gum and

- maltrodextrin particles for green tea (*Camellia sinensis* var *Assamica*) extract encapsulation. *Food Chemistry*. 261:169–175.
- Sumaryada, T., R. E. M. Simamora., & L. Ambarsari. 2018. Docking Evaluation of Catechin and its Derivatives on Fat Mass and Obesity-Associated (FTO) Protein For Anti-Obesity Agent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 08:063-068.
- Syed, A. M., & F. Nighat. 2015. *In silico* analysis and molecular docking studies of potential angiotensin-converting enzyme inhibitor using quercetin glycosides. *Pharmacognosy Magazine*. 11(1):123-126.
- Tai, Chin-Hsien., J. J. Vincent., C. Kim., & B. Lee. 2009. SE: an algorithm for deriving sequence alignment from a pair of superimposed structures. *BMC Bioinformatics*. (10).
- Tang, Chuan-He. 2019. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review). *Food Hydrocolloids*. 91:92-162.
- Ting, N. N., M. M. Sanagi., W. N. W. Ibrahim. & W. A. W. Ibrahim. 2017. Agarose-chitosan-C18 film micro-solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of phenanthrene and pyrene in chrysanthemum tea samples. *Food Chemistry*. 222:28–34.
- Tsolaki, E., P. Eleftheriou., V. Kartsev., A. Geronikaki. & A. K. Saxena. 2018. Application of Docking Analysis in the Prediction and Biological Evaluation of the Lipoxxygenase Inhibitory Action of Thiazolyl Derivatives of Mycophenolic Acid. *Molecules*. 23:1621.
- Vagadia, B.H., S. K. Vanga. & V. Raghavan. 2017. INACTIVATION METHODS OF SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR A REVIEW. *Trends in Food Science & Technology*. 64:115-125.
- Vanga, S. K., A Singh. & V. Raghavan. 2018. Changes in soybean trypsin inhibitor by varying pressure and temperature of processing: A molecular modeling study. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*. 49:31–40.
- Velickovic, T. D. C., & D. J. Stanic-Vucinic. 2018. The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive

- Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17:82-103.
- Whitaker, J. R. 1997. **Protease and alpha-amilase inhibitors of higher plant in Antinutriens anf phytochemical in food**, **Shahidi, F. (ed).** American Chem. Society. Washington, D.C.
- Winarsi, H. 2010. **Protein Kedelai dan Kecambah Manfaatnya Bagi Kesehatan**. Kanius. Yogyakarta.
- Withana-Gamage. T. S. & J. P. D. Wanasundara. 2012. Molecular modelling for investigating structureefunction relationships of soy glycinin. *Trends in Food Science & Technology*. 28:153-167.
- Yang, Y., T. Kameda., H. Aoki., D. E. Nirmagustina., A. Iwamoto., N. Kato., N. Yanaka., Y. Okazaki. & T. Kumrungsee. 2018. The effects of tempe fermented with *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, or *Rhizopus stolonifer* on the colonic luminal environment in rats. *Journal of Functional Foods*. 49:162–167.
- Yenofsky, R. L., M. Fine., & C. Lin. 1998. Isolation and characterization of a soybean (*Glycine max*) lipoxygenase-3 gene. *Mol. Gen. Genet.* 211:215-222.
- Zhang, Y-Y., K. Thakur., C.-K. Wei., H. Wang., J.-G. Zhang. & Z.-J. Wei. 2019. Evaluation of inhibitory activity of natural plant polyphenols on Soybean lipoxygenase by UFLC-mass spectrometry. *South African Journal of Botany*. 120:179–18.