DENSITOMETRY
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

# SKRIPSI

**ASRI LESTARI**

# PENETAPAN KADAR (-)-*Epigallocatechin gallate* DALAM EKSTRAK TEH (*Camellia sinensis L.*) DENGAN METODE KLT-DENSITOMETRI

T= 190 /0

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**
**BAGIAN KIMIA FARMASI**
**SURABAYA**
**2006**

**Lembar Pengesahan**

# PENETAPAN KADAR (-)-*Epigallocatechin gallate* DALAM EKSTRAK TEH (*Camellia sinensis L.*) DENGAN METODE KLT-DENSITOMETRI

## SKRIPSI

Dibuat untuk memenuhi syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2006

**Oleh :**

**ASRI LESTARI**
**NIM : 050110055 E**

Disetujui Oleh :

| Pembimbing Utama | Pembimbing Serta |
|---|---|
| **Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si.,Apt.** | **Riesta Primaharinastiti, Ssi.,M.Si.,Apt.** |
| NIP. 131653457 | NIP. 132170739 |

*" Hai para jin dan manusia jika kamu sanggup menembus ruang angkasa dan bum, tembuslah ! Tak mungkin kamu menembusnya kecuali dengan ilmu pengetahuan "*

*(QS. Ar Rahman 33)*

*Kupersembahkan skripsi ini untuk :*
*Kedua orang tuaku tercinta (Bpk.Ir. Hadi Lestari, MMAgr dan Ibu Endang Kusminingsih, S.Pd.) serta adik - adikku tercinta (Bangkit dan Bangun)*

# KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobil'alamin, segala puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan ridho-Nya sehingga penulis berhasil menyelesaikan tugas skripsi ini guna memenuhi persyaratan dalam mencapai gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dengan baik.

Selama proses penyelesaian skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dengan penuh rasa hormat, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih yang dalam kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholies Zaini,Apt selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan program sarjana.
2. Bapak Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si.,Apt dan Ibu Riesta Primaharinastiti, SSi., M.Si.,Apt selaku dosen pembimbing yang dengan kesungguhan hati dan kesabarannya memberikan bimbingan, pengarahan, dorongan, serta nasehat selama penelitian berlangsung dan selama penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Ir. Hj. Rully Susilowati, MS dan Dra. Suzana, M.Si.,Apt selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
4. Ibu Dra. Hj. Ekarina R.H., M.Kes.,Apt selaku dosen wali yang penuh pengertian memberikan bimbingan dan dorongan selama belajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
5. Seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bekal ilmu yang diberikan selama ini.
6. Bapak Dr. rer. nat. H. Mohammad Yuwono, MS.,Apt selaku kepala laboratorium Multi Purpose I atas segala fasilitas yang telah disediakan.
7. Karyawan laboratorium analisis farmasi, khususnya Pak Khusairi, Pak Haryono, Mas Fahrizal dan Mas Gunarso atas semua bantuan ilmu pengetahuan, waktu dan tenaganya selama penyelesaian skripsi ini.

8. Ketua Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga Surabaya, Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt. yang telah memberikan fasilitas laboratorium dalam menyelesaikan skripsi ini.
9. PTPN XII Perkebunan Teh Wonosari Lawang, yang telah membantu dalam penyediaan bahan penelitian.
10. Bapak, Ibu dan Adik-adikku tercinta Bangkit dan Bangun, yang telah memberikan motivasi, dorongan, semangat, restu dan doa yang tulus selama pendidikan hingga terselesaikannya skripsi ini.
11. Rekan-rekan seperjuangan, Yurika, Melly, Ika, Titin, Dewi, Chusnul, Zen, Nina, Putri, dan Virly atas kerjasama, perhatian dan bantuannya.
12. Semua pihak, khususnya teman-teman angkatan 2001 yang turut serta memberikan dorongan dan semangat pada penulis.

Akhir kata, tugas akhir ini dipersembahkan pada Almamater Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dengan harapan agar penelitian ini dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang kefarmasian dan dapat bermanfaat bagi masyarakat secara luas pada umumnya.

Surabaya, Februari 2006

Penyusun

# RINGKASAN

Teh (*Camellia sinensis L.*) yang telah dikenal sejak lama mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan. Pengaruhnya terhadap kesehatan ini, disebabkan oleh adanya kandungan flavonoid teh yang disebut katekin. Kandungan utama katekin yang sangat bermanfaat adalah (-)-*Epigallocatechin gallate* (EGCG). EGCG memiliki sifat antioksidan yang berperan dalam melawan radikal bebas yang sangat berbahaya bagi tubuh. Banyaknnya manfaat EGCG bagi kesehatan dan pentingnya jaminan mutu atau kualitas EGCG yang sampai pada masyarakat, maka diperlukan suatu metode analisis yang dapat memisahkan EGCG dengan komponen lainnya dalam matrik teh serta menetapkan kadarnya. Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar EGCG antara lain metode KLT-Densitometri dimana analisisnya dapat dilakukan secara serentak (bersamaan) dalam waktu yang relatif singkat, sederhana, *reprodusibel* dan relatif murah dibandingkan dengan metode KCKT.

Pada metodologi penelitian dilakukan uji kualitatif, validasi metode KLT-Densitometri dan penerapan metode KLT-Densitometri yang digunakan untuk penetapan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh (uji kuantitatif). Validasi metode meliputi uji selektifitas, linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi.

Pada penerapan metode KLT-Densitometri, digunakan fase diam silika gel F 254 dan sistem fase gerak terpilih adalah kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol dengan perbandingan 8:1:1:4. Panjang gelombang terpilih untuk EGCG adalah 305 nm. BD untuk EGCG 0,0153 µg, sedangkan BK EGCG 0,0508 µg. Pada uji linearitas, koefisien korelasi (r) hitung lebih besar dari r tabel, yaitu 0,9966 dan mempunyai harga Vxo 5,83 %. Diperoleh harga Xp = 0,5511 µg dan harga $X_i$ = 0,6407 µg, dimana Xp < $X_i$ sehingga disimpulkan bahwa kurva linearitas EGCG linier. Untuk akurasi diperoleh prosen perolehan kembali sebesar 80,10 %, dimana persyaratan akurasi yang dapat diterima untuk sampel hayati adalah 80-120 %. Pada presisi metode diperoleh standar deviasi (SD) 1111,8109 dan koefisien variasinya (KV) 0,15 %. Presisi alat dari penotolan standar sebanyak 10 kali dengan kadar dan volume yang sama diperoleh KV 7,72%.

Pada penerapan metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh diperoleh % kadar terhadap berat basah adalah 1,60 %. Sedangkan % kadar terhadap berat kering adalah 6,68 %.

Dari hasil penelitian ini, disimpulkan bahwa metode KLT-Densitometri dapat diterapkan untuk penetapan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh dan diharapkan dapat memberikan data atau informasi tentang metode alternatif yang dapat dilakukan untuk analisis EGCG, sehingga bermanfaat dalam proses pemantauan produk-produk yang mengandung EGCG di pasar (standarisasi).

# ABSTRACT

A simple TLC Densitometry method has been developed for the determination of (-)-Epigallocatechin gallate in tea leaves. This method uses silica gel F 254 nm and chloroform : acetic acid : formic acid : isopropanol (8:1:1:4 v/v) as a mobile phase. The maximum wavelength was detected at 305 nm. Linearity respon was found (-)-Epigallocatechin gallate between 0.6407-2.5055 µg/µl by regression Y = 8731.8272 X + 4218.8212 (r = 0.9966 and Vxo = 5.83 %). The method was validated to determine the limit detection, limit quantitation, accuracy and precision. The results showed that the limit of detection and limit of quantitation value are 0.153 µg/10µl and 0.0508 µg/10µl, repectively, whereas accuracy is 80.10 %. Coefficient variation (precision) of method and instrument are 0.15 % and 7.72 %, respectively. These results showed that TLC Densitometry can be used for determination of (-)-Epigallocatechin gallate in tea leaves.

Keyword : (-)-Epigallocatechine gallate, TLC-Densitometry, tea, validation

# DAFTAR ISI

**Halaman**

LEMBAR PENGESAHAN ..... iii
KATA PENGANTAR ..... iv
RINGKASAN ..... vi
ABSTRAK ..... vii
DAFTAR ISI ..... viii
DAFTAR TABEL ..... xi
DAFTAR GAMBAR ..... xii
DAFTAR LAMPIRAN ..... xiii
BAB I PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang Masalah ..... 1
1.2 Rumusan Masalah ..... 3
1.3 Tujuan Penelitian ..... 3
1.4 Hipotesis ..... 4
1.5 Manfaat Penelitian ..... 4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Tinjauan Tentang EGCG ..... 5
2.2 Tinjauan Tanaman Teh ..... 6
2.2.1 Klasifikasi Tanaman Teh ..... 7
2.2.2 Jenis Tanaman Teh ..... 7
2.2.3 Kandungan Tanaman Teh ..... 8
2.2.4 Manfaat Tanaman Teh ..... 8
2.3 Tinjauan Tentang Ekstraksi ..... 9
2.4 Tinjauan Tentang Kromatografi ..... 9
2.5 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis ..... 10
2.6 Tinjauan Tentang Tehnik Penampakan noda ..... 12
2.7 Tinjauan Tentang Densitometri ..... 12
2.7.1 Analisis Kualitatif Dengan KLT-Densitometri ..... 14
2.7.2 Analisis Kuantitatif Dengan KLT-Densitometri ..... 14

2.8 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis.....14
2.8.1 Selektifitas.....15
2.8.2 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....15
2.8.3 Linieritas.....16
2.8.4 Akurasi .....17
2.8.5 Presisi .....18
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL
3.1 Uraian Tentang Kerangka Konseptual .....19
3.2 Bagan Kerangka Konseptual .....21
BAB IV METODE PENELITIAN
4.1 Alat dan Bahan.....22
4.1.1 Alat.....22
4.1.2 Bahan .....22
4.2 Rancangan Penelitian .....22
4.3 Tahapan dan Prosedur Penelitian.....23
4.3.1 Preparasi Sampel .....23
4.3.1.1 Penentuan Kadar Air.....23
4.3.1.2 Penyiapan Sampel Daun Teh .....24
4.3.1.3 Ekstraksi Daun Teh.....24
4.3.2 Validasi Metode .....24
4.3.2.1 Selektifitas .....24
A. Fase Diam .....24
B. Pembuatan Fase Gerak.....24
C. Penentuan Panjang Gelombang Terpilih .....25
4.3.2.2 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....25
4.3.2.3 Penentuan Linieritas.....26
4.3.2.4 Penentuan Akurasi .....26
4.3.2.5 Penentuan Presisi .....26
A. Presisi Alat.....26
B. Presisi Metode.....27
4.3.3 Penetapan Kadar EGCG Dalam Sampel .....27

BAB V HASIL PENELITIAN.....28
5.1 Selektifitas.....28
5.2 Penentuan Panjang Gelombang Terpilih.....29
5.3 Uji Linieritas.....31
5.4 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK).....33
5.5 Akurasi.....34
5.6 Presisi Alat.....35
5.7 Presisi Metode.....36
5.8 Penetapan Kadar EGCG dalam Ekstrak Teh.....36
BAB VI PEMBAHASAN.....38
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....41
DAFTAR PUSTAKA.....42
LAMPIRAN.....45

# DAFTAR TABEL

**Halaman**

Tabel 5.1 Harga faktor retardasi (Rf) EGCG dari beberapa sistem fase gerak.....28

Tabel 5.2 Hasil pengamatan serapan larutan standar EGCG untuk pembuatan kurva linieritas .....31

Tabel 5.3 Penentuan harga Sb .....33

Tabel 5.4 Penentuan harga Sl.....33

Tabel 5.5 Akurasi EGCG pada sampel ekstrak daun teh.....34

Tabel 5.6 Presisi alat KLT-Densitometer untuk analisis EGCG.....35

Tabel 5.7 Presisi metode.....36

Tabel 5.8 Penetapan kadar EGCG dalam ekstrak teh.....37

# DAFTAR GAMBAR

**Halaman**

Gambar 2.1 (-)-*Epigallocatechin gallate* .....6

Gambar 5.1 Spektra serapan EGCG menggunakan Densitometer dengan fase gerak kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (8:1:1:4) .....29

Gambar 5.2 Hasil kromatogram sampel dan standar EGCG pada panjang gelombang 305 nm dengan menggunakan KLT-Densitometer .....30

Gambar 5.3 Kurva linieritas larutan standar EGCG menggunakan metode KLT-Densitometri .....32

# DAFTAR LAMPIRAN

**Halaman**

Lampiran 1 Perhitungan Vxo..... 45
Lampiran 2 Perhitungan pembuktian Xp..... 46
Lampiran 3 Perhitungan BD dan BK..... 48
Lampiran 4 Contoh perhitungan prosen rekoveri..... 49
Lampiran 5 Contoh perhitungan penetapan kadar..... 50
Lampiran 6 Penetapan kadar air..... 51
Lampiran 7 Tabel r ..... 52
Lampiran 8 Tabel ..... 53

# BAB I

# PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang Masalah

Teh telah dikenal dan dikonsumsi sejak tahun 2700 SM, bahkan telah dijadikan komponen dari ramuan obat sejak abad ke-4 M oleh bangsa Asia. Pada awalnya teh yang berasal dari tanaman perdu *Camellia sinensis* L. ini, dikenal karena kandungan kafeinnya yang cukup tinggi sebagai stimulan sistem saraf pusat. Tetapi dalam perkembangannya, hasil riset menunjukkan bahwa teh mempunyai fungsi yang lebih kompleks dari sekedar stimulan sistem saraf pusat. Beberapa khasiat teh antara lain sebagai antioksidan, antitrombolitik, antikarsinogenik, antimelanogenesis, antimikrobial dan lain sebagainya. Khasiat teh ini dikarenakan oleh adanya senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung didalamnya. Kandungan utama teh antara lain: *Epigallocatechin gallate* (EGCG), disamping kandungan lainnya seperti *Epicatechin* (EC), *Epigallocatechin* (EGC), *Epicatechin gallate* (ECG), kafein dan teobromin (Sibuea, 2003).

Berdasarkan proses pengolahannya, teh dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis yaitu teh hijau, teh oolong dan teh hitam. Produksi teh hitam dan teh oolong melibatkan proses fermentasi penuh dan semi fermentasi yang dapat merusak kandungan polifenol (termasuk EGCG). Sebaliknya pada proses produksi teh hijau menggunakan teknologi penguapan (steaming) daun teh dengan suhu tinggi sehingga dapat menginaktifkan enzim oksidasi yang pada akhirnya dapat mempertahankan kandungan polifenol (Khomsan, 2003).

EGCG *(Epigallocatechin gallate)* adalah salah satu kandungan polifenol dalam tanaman teh. Sumber EGCG utama didapatkan pada daun teh yang muda dan utuh, dimana kandungannya dalam 100 gram daun teh kering adalah 7,89 gram (Hartoyo, 2003). EGCG merupakan komponen bioaktif tanaman teh yang mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan.

EGCG adalah antioksidan yang kuat karena berpengaruh protektif terhadap sel, sehingga mampu mencegah kerusakan DNA dari berbagai pengaruh senyawa

awetan, tebalnya asap rokok dan terkontaminasinya darah oleh alkohol. Rusaknya DNA akibat radikal bebas menyebabkan terjadinya penyakit kanker dan gangguan pada jantung. EGCG mampu menurunkan kecepatan oksidasi LDL sesuai dengan sifatnya sebagai antioksidan, sehingga resiko penyumbatan pembuluh darah yang menyebabkan penyakit jantung dapat ditekan. Aktivitas antioksidan senyawa polifenol dari yang terkecil adalah EC<ECG<EGC<EGCG. Sedangkan antikarsinogeniknya berfungsi untuk mencegah munculnya sel-sel yang terkena mutagen yang dapat memicu terjadinya penyakit tumor dan kanker, seperti yang telah dilakukan pada hewan coba dimana EGCG mampu menghambat invasi sel kanker hingga 83 % pada konsentrasi 10 µg/ml. Sebagai antitrombolitik EGCG dapat mencegah terjadinya agregasi platelet secara berlebihan yang dapat menghambat sirkulasi darah serta secara potensial mengakib itkan resiko penyakit jantung dan stroke. Fungsi antimikrobial ditunjukkan dengan menghambat aktivitas biologis bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* dalam mencegah *caries* pada gigi serta menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri *Clostridium* penyebab keracunan, kematian mendadak, penuaan, mutagenesis dan karsinogenesis karena aktivitas selektifnya sebagai antimikrobial. Senyawa turunan polifenol antara lain katekin (EGCG, EGC, ECG dan EC), hidrokinon, pirokatekol dan resolsinol telah sejak lama dikenal sebagai antimelanogenesis yang bekerja menghambat enzim tirosinase yang mampu mengkatalisis pembentukan melanin dengan mengubah L-tirosin menjadi L-DOPA, depakinon dan melanokrom. Diharapkan senyawa polifenol dalam teh ini dapat mencegah dan menekan penyakit pigmentasi pada sel-sel manusia. Disamping itu kandungan EGCG dapat menghambat aktivitas enzim yang mengatur tekanan darah dan dapat mengurangi penyerapan vitamin $B_1$ yang mengakibatkan berkurangnya aktivitas metabolisme gula sehingga dapat menurunkan berat badan, serta dapat menurunkan tekanan darah bagi penderita tekanan darah tinggi (Khomsan, 2003).

Banyaknnya manfaat EGCG dalam teh bagi kesehatan dan pentingnya jaminan mutu atau kualitas EGCG yang sampai pada masyarakat, maka diperlukan suatu metode analisis yang dapat memisahkan EGCG serta

diperlukan suatu metode analisis yang dapat memisahkan EGCG serta menetapkan kadarnya tanpa terpengaruh oleh senyawa polifenol yang lain.

Metode KLT-Densitometri adalah metode yang dapat digunakan untuk analisis baik kualitatif maupun kuantitatif. Analisisnya dapat dilakukan secara serentak (bersamaan) dalam waktu yang relatif singkat, sederhana, *reprodusibel* dan relatif murah dibandingkan dengan metode KCKT. Metode ini juga mempunyai ketelitian yang cukup baik karena dapat digunakan untuk mengukur sampel dalam jumlah mikrogram.

Dalam penelitian ini dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif terhadap EGCG dalam daun teh dengan metode KLT-Densitometri. Pemilihannya didasarkan selain pada keuntungan-keuntungan yang telah tersebut diatas, juga dikarenakan KLT-Densitometri dapat mengidentifikasi golongan senyawa atau senyawa-senyawa komponennya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasar uraian latar belakang di atas, yang menjadi permasalahannya adalah :

1. Berapakah harga batas deteksi dan batas kuantitasi, koefisien korelasi, koefisien variasi dan prosen rekoveri untuk validasi metode pada analisis EGCG pada ekstrak daun teh secara KLT-Densitometri ?
2. Apakah metode KLT-Densitometri dapat diterapkan untuk pemisahan dan penetapan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh ?
3. Berapakah kadar EGCG dalam sampel ekstrak daun teh?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang akan dicapai pada penelitian ini adalah :

Menetapkan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh dengan menggunakan metode KLT-Densitometri.

## 1.4 Hipotesis

Metode KLT-Densitometri dapat digunakan untuk menetapkan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data atau informasi tentang metode alternatif yang dapat dilakukan untuk analisis EGCG, sehingga bermanfaat dalam proses pemantauan produk-produk yang mengandung EGCG di pasar (standarisasi).

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Tinjauan Tentang EGCG

Komponen bioaktif utama teh adalah polifenol yang dikenal memiliki khasiat antioksidan yang tinggi. Kandungan polifenol terbesar adalah EGCG, dimana EGCG dalam 100 gram daun teh kering kandungannya adalah 7,89 gram (Hartoyo, 2003).

Rumus kimia : $C_{22}H_{18}O_{11}$
Berat molekul : 458,4
Titik lebur : 218 °C
Pemerian : serbuk putih
Kelarutan : sangat mudah larut dalam air (1:0,2)
Penyimpanan : stabil dalam bentuk larutan pada temperatur 2 sampai 8 °C dan penyimpanan pada tempat yang kering, bebas udara dan cahaya pada kurun waktu sedikitnya 2 tahun (Anonim, 2005)

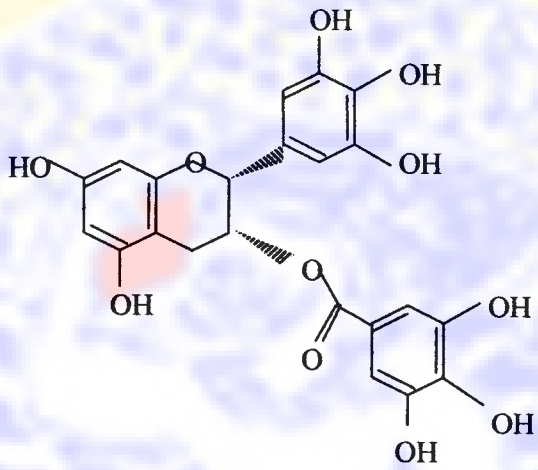
Manfaat EGCG sangat banyak, diantaranya berfungsi sebagai antioksidan, mencegah penyakit kanker, jantung, resiko penyumbatan pembuluh darah, antimikrobial, dan antimelanogenesis. EGCG mempunyai kemampuan dalam menangkap radikal bebas 100 kali lebih poten dari vitamin C dan 25 kali lebih aktif dibandingkan vitamin E (Fulder, 2004).

Khasiat antioksidan yang tinggi dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Osada et al (2001) yang menunjukkan bahwa dengan waktu oksidasi 180 menit kelompok tanpa perlakuan EGCG mengalami oksidasi 25-26 %, sedangkan kelompok dengan perlakuan EGCG hanya mengalami oksidasi 10-12 %.

EGCG dengan kemampuan antitrombolitiknya dapat mencegah agregasi platelet yang secara potensial dapat menyebabkan penyakit jantung dan stroke. Hal tersebut dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan Kang et al (1999) pada 9.510 wanita Jepang yang berusia diatas 40 tahun, bahwa resiko terkena stroke (biasanya terkait dengan trombosis) didapatkan lebih rendah pada populasi yang

mengkonsumsi teh (banyak terdapat kandungan EGCG) sebanyak 3-5 cangkir sehari dibandingkan dengan populasi yang tidak mengkonsumsinya.

Peran teh yang mengandung EGCG dalam kadar tinggi juga dapat menghambat aktivitas biologis dari bakteri *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sobrinus* yang menyababkan *caries* pada gigi, dengan konsentrasi penghambatan sebesar 0,25-1,0 mg/ml (Khomsan, 2003).




Gambar 2.1 (-)-*Epigallacatechin gallate*

## 2.2 Tinjauan Tentang Tanaman Teh

Untuk mendapatkan pertumbuhan tanaman teh (*Camellia sinensis* L.) yang optimal, diperlukan syarat-syarat lingkungan khusus. Tidak semua daerah dapat ditanami teh, jika ditanam di daerah yang tidak sesuai maka tanaman teh akan tumbuh tidak optimal dan akan berakibat pula pada produksi daun yang kurang baik. Oleh karenanya diperlukan persyaratan tertentu agar tanaman teh dapat tumbuh optimal, diantaranya ketinggian tempat dari permukaan air laut, temperatur serta curah hujan.

Tanaman teh dapat tumbuh dengan baik di daerah tropis dan subtropis dengan ketinggian antara 200 sampai dengan 2000 meter diatas permukaan laut atau dataran tinggi dan pegunungan yang berhawa sejuk. Curah hujan yang diperlukan untuk optimalnya pertumbuhan tanaman teh sepanjang tahun tidak kurang dari 1,500 mm. Tanaman teh membutuhkan kelembaban tinggi dengan temperatur udara 13-29,5 °C (Anonim, 2003).

### 2.2.1 Klasifikasi Tanaman Teh

| | |
|---|---|
| Kingdom | : Plantae |
| Divisio | : Spermatophyta |
| Subdivisio | : Angiospermae |
| Class | : Dicotyledonae |
| Ordo | : Guttifefales |
| Famili | : Theaceae |
| Genus | : Camellia |
| Species | : Camellia sinensis L. |
| Sinonim | :Thea sinensis L, Thea assamica Master, Camellia theifera Dyer, Camellia thea Link (Dayat, 1981) |

### 2.2.2 Jenis Tanaman Teh.

Secara umum berdasarkan cara atau proses pengolahannya, teh dapat diklasifikasikan menjadi tiga jenis, yaitu teh hijau, teh oolong, dan teh hitam.

Teh hijau (*green tea*), dibuat dengan cara menginaktifasi enzim oksidase atau fenolase yang ada dalam pucuk daun teh segar, dengan cara pemanasan atau penguapan menggunakan uap panas, sehingga oksidasi enzimatik terhadap katekin dapat dicegah (pengolahannya tidak melalui proses fermentasi). Teh hijau sangat populer di Cina dan Jepang oleh karena itu teh jenis ini paling dipercaya berkhasiat untuk kesehatan.

Teh oolong (*oolong tea*), dihasilkan melalui proses pemanasan yang dilakukan segera setelah proses *rolling* atau penggulungan dengan tujuan untuk menghentikan proses fermentasi. Oleh karena itu, teh oolong disebut sebagai teh semi fermentasi.

Teh hitam (*black tea*), dibuat dengan cara memanfaatkan terjadinya oksidasi enzimatis terhadap kandungan katekin teh atau dapat dikatakan teh jenis ini mengalami proses oksidasi enzimatis secara sempurna (Hartoyo, 2003).

### 2.2.3 Kandungan Tanaman Teh.

Tanaman teh mempunyai banyak kandungan yang bermanfaat, antara lain kandungan senyawa polifenol, kafein, teobromin, L-teanin, dan fluorida.

Salah satu golongan senyawa bioaktif dalam teh adalah golongan polifenol, termasuk didalamnya terdapat flavonoid yang meliputi flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, biflavan, antosianidin, dan katekin. Katekin teh merupakan golongan flavonoid yang mempunyai kandungan utama antara lain EC, ECG, EGC dan EGCG. Katekin teh memiliki sifat tidak berwarna, larut air, serta terdapat sifat pahit dan astringensi atau kelat pada seduhan teh. Sedangkan flavanol teh kandungan utamanya antara lain adalah qursetin, kaemferol, dan myrisetin. Flavanol terutama terdapat dalam bentuk aglikonnya. Jumlah flavonol teh ini bervariasi, salah satunya tergantung suhu dan ekstraksi (Hartoyo, 2003).

### 2.2.4 Manfaat Tanaman Teh

Manfaat yang didapat dengan mengkonsumsi teh sangat banyak antara lain karena kandungan kafein dapat memberikan efek stimulan, kandungan tanin yang berkemampuan menguraikan lemak, fluorida yang dapat menguatkan email gigi dan mencegah karang gigi dan polifenol teh merupakan antioksidan yang kekuatannya 100 kali lebih efektif dibanding vitamin C dan 25 kali lebih tinggi dibanding vitamin E dalam melindungi sel dari kerusakan yang berhubungan dengan kanker, penyakit jantung, penuaan dan lain sebagainya. Polifenol bermanfaat untuk mencegah radikal bebas yang merusak DNA dan menghentikan perkembangbiakan sel kanker. Pada penelitian lainnya dengan subyek usia lanjut di Belanda yang menunjukkan bahwa resiko kematian akibat jantung menurun seiring dengan kebiasaan minum teh. Penumpukan plak di arteri yang menyebabkan terjadinya penyakit jantung koroner dapat ditekan oleh senyawa yang terkandung dalam teh. Dalam sebuah penelitian di Shanghai membuktikan bahwa teh memberikan perlindungan terhadap munculnya kanker esophageal, manfaat ini akan lebih besar lagi jika tidak diiringi merokok atau minuman keras. Senyawa-senyawa dalam teh juga mampu melawan kegiatan bakteri *Sterptococcus mutans* yang menyebabkan kerusakan jaringan gusi dan tanggalnya gigi (Anonim, 2003).

## 2.3 Tinjauan Tentang Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dimana zat terlarut (solut) didistribusikan diantara dua pelarut (solven) yang tidak saling campur (Pecsok, 1976). Ekstraksi dalam istilah farmasi adalah pemisahan senyawa obat aktif yang terdapat dalam jaringan tanaman atau hewan dari komponen yang tidak aktif atau "inert" menggunakan pelarut dan prosedur tertentu (Gennaro, 1995).

Prinsip dasar proses ekstraksi cair-cair dinyatakan berdasarkan Hukum Distribusi atau Partisi Nerst, dimana keadaan suatu sistem yang terdiri dari dua cairan yang tidak saling campur bila ditambahkan zat yang dapat larut dalam keduanya, maka zat tersebut akan terdistribusi dalam kedua sistem dengan perbandingan yang tetap pada suhu tertentu. Hukum Distribusi banyak digunakan dalam proses ekstraksi, analisis dan penentuan tetapan kesetimbangan (Dunn, 1986).

Dengan rumus $C_1/C_2 = Kd$, dimana $C_1$ adalah konsentrasi zat pelarut dalam pelarut pertama, $C_2$ adalah konsentrasi zat dalam pelarut kedua (pelarut pengekstraksi) yang tidak campur dengan pelarut pertama dan Kd adalah koefisien distribusi atau partisi, maka Kd didapat dengan membandingkan konsentrasi zat dalam pelarut pertama dan pelarut kedua dalam suhu yang sama (Martin, 1993). Harga Kd berubah sedikit dengan naiknya konsentrasi. Harga Kd juga berubah dengan perubahan temperatur. Harga Kd tergantung jenis pelarut dan zat terlarutnya (Sukardjo, 1997).

Harga ekstraksi yang sempurna selain dipengaruhi oleh koefisien distribusi, juga dipengaruhi oleh volume cairan dan jumlah penggulangan ekstraksi (James, 1986).

## 2.4 Tinjauan Tentang Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat kimia berdasarkan pada perbedaan migrasi masing-masing komponen campuran pada fase diam dibawah pengaruh fase gerak atau pelarut yang bergerak (Mulya, 1996).

Digunakkan suatu lapis tipis adsorben yang ditaburkan pada bahan yang inert (kaca, plastik, alumunium, logam metal) sebagai fase diamnya. Fase gerak bergerak melalui fase diam dengan aksi kapilaritas, terkadang juga dibantu oleh

gravitasi dan tekanan. Pemisahan pada kromatografi lapis tipis didasarkan pada prinsip adsorbsi, partisi, pertukaran ion, maupun kombinasi tergantung pada bahan yang dipakai (Fried & Sherma, 1994). Namun pada umumnya adalah atas dasar adsorbsi dan partisi (Touchstone, 1983).

Kemampuan komponen untuk terdistribusi dalam fase diam dan fase gerak tergantung pada konstanta yang disebut dengan koefisien distribusi (Kd), dimana harga Kd adalah :

$$K = \frac{Cs}{Cm}$$

Keterangan :

$C_S$ = Konsentrasi solut dalam fasa diam

$C_m$ = Konsentrasi solut dalam fase gerak

## 2.5. Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu jenis kromatografi cair, dimana sampel ditotolkan berupa titik (*spot*) pada lapisan tipis yang menempel pada sebuah pelat gelas, plastik atau logam (Fried & Sherma, 1994). KLT dapat digunakan untuk analisis kualitatif antara lain identifikasi suatu zat, deteksi adanya pemalsuan atau pengotoran zat dan analisis kuantitatif dari suatu zat tunggal maupun campuran (Skoog, 1998).

Fase gerak pada KLT dapat menggunakan pelarut tunggal maupun campuran beberapa pelarut organik atau anorganik. Pemilihan fase gerak sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang akan dipisahkan. Banyak fase diam yang digunakan, antara lain : silika gel, selulosa, alumina, poliamida dan silika gel yang terikat secara kimia (Fried & Sherma, 1994). Aktivitas dari sebuah fase diam ditentukan oleh area permukaannya, sifat kimia,dan susunan geometris atom-atom penyusun permukaan fase diam tersebut (Hamilton & Hamilton, 1987)

Analisis kuatitatif dengan kromatografi lapis tipis pada prinsipnya dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu :

1. Penentuan tidak langsung dari noda kromatogram

Pada cara ini noda yang terjadi dikerok dari lapisan tipis kemudian diekstraksi dengan pelarut organik. Dari ekstrak yang didapat dilakukan

diekstraksi dengan pelarut organik. Dari ekstrak yang didapat dilakukan penentuan kuantitatif dengan metode yang sesuai dengan kalorimetri, spektrofotometri, volumetri dan sebagainya.

2. Penentuan langsung noda kromatogram

Pada cara ini dilakukan dengan membandingkan luas noda sampel dengan luas noda pembanding atau membandingkan sifat optik noda dengan alat densitometri. Untuk pengamatan noda hasil pemisahan pada kromatogram dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Menggunakan sinar ultra violet untuk bahan-bahan yang dapat berfluoresensi
2. Menyemprotkan suatu larutan peraksi

Retensi pada fase diam besarnya tergantung dengan harga Rf (faktor retardasi), yaitu :

$$Rf = \frac{jarak\ \ yang\ \ ditempuh\ \ solut}{jarak\ \ yang\ \ ditempuh\ \ solven}$$

Untuk mendapatkan area noda dengan hasil lebih konstan, maka rentang harga Rf sebaiknya 0,3 sampai 0,8 (Touchstone, 1983).

Parameter pemisahan lainnya adalah resolusi analit satu dengan yang lain sebaiknya mendekati 1,5. Bila resolusi kurang dari 1,2 perlu dilakukan optimasi panjang elusi lagi, oleh sebab itu fase gerak yang digunakan harus dapat memisahkan komponen-komponen yang terdapat dalam campuran dengan baik (Skoog, 1998).

Resolusi dua kromatogram pada KLT dinyatakan sebagai :

$$RS = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(dR)_A - (dR)_B}{W_A + W_B}$$

Keterangan :

Rs = resolusi

Z = jarak antara dua analit

$W_A$ = lebar noda analit A

$W_B$ = lebar noda analit B

$(dR)_A$ = jarak yang ditempuh oleh analit A

$(dR)_B$ = jarak yang ditempuh oleh analit B

## 2.6 Tinjauan Tentang Teknik Penampakan Noda

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah divisualisasi dengan cara fisika atau kimia. Visualisasi cara fisika yaitu dengan melihat noda kromatogram yang mengabsorbsi radiasi ultra violet (UV) atau berfluoresensi dengan radisi UV pada panjang gelombng 254 nm atau 365 nm. Pada adsorben yang berfluoresensi dengan radiasi UV karena telah dicampurkan dengan zat kimia yang berfluoresensi maka noda akan tampak sebagai peristiwa pemadaman fluoresensi (*Quenching fluorescence*). Visualisasi cara kimia dilakukan dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi yang spesifik yaitu dengan penyemprotan menggunakan atomizer, atau memberikan uap zat kimia pada kromatogram atau dengan cara pencelupan kedalam pereaksi penampak noda (Mulya & Suharman, 1995).

## 2.7 Tinjauan Tentang Densitometri

Densitometri merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis kuantitatif maupun analisis kualitatif yang berdasarkan dari kerapatan optik dari kromatogram. Teknik ini memungkinkan pengukuran panjang gelombang serapan maksimum untuk mencapai kepekaan yang lebih besar. Densitometri memberikan peluang yang besar untuk analisis kuantitatif untuk komponen-komponen yang memiliki kadar yang relatif kecil dalam suatu zat atau campuran zat setelah dipisahkan terlebih dahulu dengan kromatografi lapis tipis (Munson, 1991).

Prinsip Densitometri didasarkan atas pengukuran intensitas cahaya yang dipantulkan kembali oleh suatu noda. Apabila pada plat tidak terdapat noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Tetapi bila cahaya tersebut dijatuhkan pada bagian plat dimana terdapat noda dari suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas sinar yang datang.

Pada densitometri hubungan antara serapan dan konsentrasi dapat dijelaskan dengan teori Kubelka-Munk.

Secara teoritis Kubelka-Munk mencari hubungan antara kerapatan optik dengan serapan analit sebagai noda kromatogram terhadap hamburan radiasi, yang dinyatakan sebagai berikut :

$$-\frac{dI}{dX} = +(S+K)I + SJ$$

$$-\frac{dJ}{dX} = -(S+K) + SJ$$

Keterangan :

I = intensitas REM yang arahnya tegak lurus menuju permukaan plat KLT

J = intensitas REM yang arahnya tegak lurus meninggalkan permukaan plat KLT

S = faktor hamburan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis

K = faktor penyerapan untuk tiap satu satuan tebal lapisan tipis

X = tebal lapisan tipis plat KLT

Untuk harga X = 0 maka perbandingan intensitas cahaya yang dipantulkan (Ir) dengan intensitas cahaya yang datang ($I_o$) disebut pantulan (R). sedangkan untuk harga X = x (tebal lapisan), perbandingan intensitas cahaya yang datang disebut transmitan (T). Hubungan tersebut secara matematika dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$T = T_O = \frac{1}{SX+1}$$

$$R = R_O = \frac{SX}{SX+1}$$

Keterangan :

X = tebal lapisan tipis

T = transmitan

R = reflektan

Koefisien penghamburan (SX) dari suatu lempengan tipis tergantung pada ukuran dan distribusi adsorban yang digunakan. Oleh karena itu harga dan koefisien penghamburan dalam percobaan perlu diketahui.

Pada dasarnya sistem optik densitometri dapat dikelompokkan dalam beberapa jenis, antara lain :

1. Berdasarkan transmisi sinar tampak yang melewati noda bahan. Hanya untuk noda-noda yang berwarna atau diwarnai dan lapisan tipis dibuat pada lempeng kaca yang dapat tembus cahaya dan harus benar-benar homogen.
2. Berdasarkan absorbsi sinar ultra violet atau sinar tampak yang dipantulkan oleh bahan.
3. Berdasarkan absorbsi fluoresensi sinar yang dipantulkan oleh noda bahan (untuk bahan yang berfluoresensi).

Hasil pengukuran diteruskan pada rekorder hingga didapat hasil yang berupa puncak-puncak. Luas puncak dari rekorder noda bahan dan noda pembanding dibandingkan (Touchstone & Sherma, 1979).

### 2.7.1 Analisis Kualitatif Dengan KLT-Densitometri

Analisis kualitatif dengan densitometri dilakukan atas dasar harga jarak noda kromatogram sampel dibandingkan dengan jarak noda kromatogram baku atau standar (faktor retardasi = Rf). Analisis kualitatif dengan densitometri dapat juga dilakukan atas dasar panjang gelombang maksimum, yaitu panjang gelombang pada saat harga serapannya maksimum (Touchstone & Sherma, 1979).

### 2.7.2 Analisis Kuantitatif Dengan KLT-Densitometri

Penggunaan Densitometer untuk analisis kuantitatif didasarkan atas pengukuran kerapatan optik noda kromatogram. Kerapatan optik tersebut dinyatakan dalam bentuk area noda kromatogram. Perhitungan kadar suatu zat yang dianalisis dilakukan dengan cara membandingkan area analit dengan area zat baku atau standar (Touchstone, 1983).

## 2.8 Tinjauan Tentang Validasi Metode Analisis

Validasi metode merupakan suatu bagian yang sangat penting untuk penetapan kadar suatu zat yang akan dianalisa, yang bertujuan untuk memastikan bahwa metode analisis yang akan dioptimasi, serta parameter-parameternya memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan (Wahlich & Carr, 1990).

Parameter-parameter validasi yang dipakai untuk validasi metode meliputi : selektivitas, limit deteksi, limit kuantitasi, linearitas, akurasi dan presisi (Anonim, 2002).

### 2.8.1 Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan untuk mengukur analit secara akurat bila analit bersama dengan komponen lain yang ada, misalnya pengotor, produk hasil degradasi dan komponen matrik (Anonim, 2002).

Selektifitas merupakan langkah awal yang harus dilakukan untuk memastikan puncak analit atau noda kromatogram KLT analit tidak terganggu dengan zat lain, maka hasil analisis yang diperoleh akan menyimpang dari keadaan yang sebenarnya. Resolusi analit dengan analit lainnya sebaiknya > 1,5 dan resolusi yang kecil (< 1,2) perlu dilakukan optimasi lagi pada kondisi kromatografi yang dilakukan (Skoog, 1998). Faktor retardasi (Rf) yang dihasilkan sebaiknya antara 0,3-0,8 (Touchstone, 1983)

### 2.8.2 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (BD) adalah jumlah analit terkecil analit dalam sampel yang bisa terdeteksi tetapi tidak perlu dikuantitasi, dibawah kondisi percobaan yang dilakukan (Anonim, 2002).

Batas kuantitasi (BK) adalah parameter kuantitasi dimana jumlah analit terendah dalam matrik sampel dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi percobaan yang dilakukan (Anonim, 2002).

Kadar tersebut harus mampu memberi respon detektor atau tinggi puncak dibanding simpangan maksimal dari derau garis dasar yang nilainya 3x lebih besar untuk BD dan 10x lebih besar untuk BK. Untuk menghitung BD dan BK digunakan rumus sebagai berikut :

$$C = K\frac{Sb}{Sl} \quad \text{dimana,} \quad Sb\frac{Np - p}{5}$$

Keterangan :

C = kadar analit pada BD & BK

K = konstanta (K=3 untuk BD dan K=10 untuk BK)

Sl = slope antara kadar dan tinggi puncak analit

Sb = standar deviasi dari sinyal blanko

$N_{P-P}$ = puncak tertinggi dikurangi puncak terendah

### 2.8.3 Linearitas

Linearitas adalah kemampuan untuk merespon hasil uji secara langsung atau perhitungan menurut hubungan matematis yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel pada trayek tertentu.

Linearitas dinyatakan dalam istilah variasi sekitar slope dari garis regresi yang dihitung menurut hubungan matematis dari hasil yang diperoleh dari hasil analit dengan kadar analit bervariasi. Penentuan linearitas menggunakan 5 macam konsentrasi dimana ke 5 macam konsentrasi tersebut dapat berkisar antara 80-120 %, 50-150 % atau 25-200 % dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2003)

Linearitas adalah suatu metode yang harus diuji untuk membuktikan adanya hubungan liniear antara konsentrasi analit dengan respon detektor (Anonim, 2002). Pengujian linearitas dilakukan pada salah satu dari tiga macam rentang konsentrasi diatas .

Untuk menyatakan adanya korelasi atau tidak, digunakan parameter koefisien korelasi (r) pada analisis regresi y = bx + a. Linearitas memenuhi syarat apabila harga r hitung lebih besar dari harga r tabel.

$$a = \frac{n\sum xy - \sum x \sum y}{n\sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{\sum y - a\sum x}{n}$$

$$r = \frac{n\sum(Xi.Yi) - (\sum Xi)(\sum Yi)}{\sqrt{\{n\sum Xi^2 - (\sum Xi)^2\}\{n\sum Yi^2 - (\sum Yi)^2\}}}$$

Keterangan :

r = koefisien korelasi

Xi = jumlah zat yang diamati

Yi = area kromatogram

n = jumlah noda

Parameter lain yang perlu ditentukan adalah deviasi rata-rata dari garis regresi (Sy), standar deviasi fungsi (Sxo) dan koefisien variasi dari fungsi (Vxo). Persamaan yang memepunyai nilai Vxo paling kecil dapat dipilih untuk pengerjaan analisis selanjutnya. Harga Vxo sebaiknya tidak lebih dari 5 % (Wahlich & Carr, 1990).

Suatu kurva baku dapat digunakan untuk perhitungan kuantitatif bila telah dibuktikan dengan statistik bahwa konsentrasi analit terkecil (Xi) berbeda signifikan dengan nol. Untuk itu harus dibuktikan bahwa harga Xp harus lebih kecil dari Xi (Indrayanto, 1994).

### 2.8.4 Akurasi

Akurasi metode analisis adalah keterdekatan hasil uji yang didapat dengan metode tertentu dengan kadar sebenarnya. Akurasi sering digambarkan sebagai % rekoveri (% perolehan kembali), melalui pengujian sejumlah analit tambahan yang diketahui dalam sampel. Akurasi juga dinyatakan sebagai perbedaan antara rata-rata harga yang diperoleh dengan harga sebenarnya yang dapat diterima dengan interval kepercayaan (Anonim, 2002).

$$R = \frac{Csp}{Ksp} x100\%$$

$$Csp = \frac{Asp}{Ast} xCst$$

Keterangan :

R = Prosen perolehan kembali

Csp = Kadar yang didapatkan kembali

Ksp = Kadar sesungguhnya

Asp = Area sampel

Ast = Area standar

Cst = Konsentrasi standar

### 2.8.5 Presisi

Presisi adalah derajat keterulangan diantara hasil uji secara individual jika prosedur dilakukan berulang pada berbagai sampling yang dilakukan berulang kali dari sampel yang homogen. Paramater presisi biasanya dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) atau koefisien variasi (KV) dari beberapa seri pengukuran. Harga koefisien variasi tidak boleh lebih besar dari 5% (Skoog, 1998), tetapi untuk sampel biologis persyaratan presisi yang dapat diterima adalah kurang dari 10 % (Cunif, 1995). KV dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$KV = \frac{SD}{\overline{X}} x100\%$$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X - \overline{X^2}}{N-1}}$$

Keterangan :

SD = standar deviasi

X = kadar sampel

$\overline{X}$ = kadar sampel rata-rata

KV = koevisien variasi

N = jumlah data

# BAB III

# KERANGKA KONSEPTUAL

## 3.1 Uraian Tentang Kerangka Konseptual

Teh merupakan salah satu minuman yang sangat populer didunia. Teh dibuat dari pucuk daun muda tanaman teh (*Camellia sinensis L.)*. Selain sebagai tradisi minuman yang menyegarkan, teh telah lama diyakini memiliki khasiat bagi kesehatan tubuh.

Beberapa tahun terakhir, teh mendapat banyak perhatian berkaitan dengan sifat potensial fisiologisnya sebagai antimutagenik dan antitumorigenik, selain manfaat lainnya antara lain sebagai antimikrobial, antimelanogenesis, mencegah penyumbatan pembuluh darah dan lain sebagainya. Studi epidemiologi juga menunjukkan bahwa tingginya konsumsi teh memiliki hubungan negatif dengan terjadinya penyakit jantung dan kanker.

Pengaruhnya terhadap kesehatan ini, dari berbagai penelitian diketahui terutama disebabkan oleh adanya kandungan flavonoid teh yang disebut katekin. Kandungan utama katekin yang sangat bermanfaat adalah EGCG. EGCG memiliki sifat antioksidan yang berperan dalam melawan radikal bebas yang sangat berbahaya bagi tubuh karena dapat menimbulkan berbagai penyakit (Hartoyo, 2003).

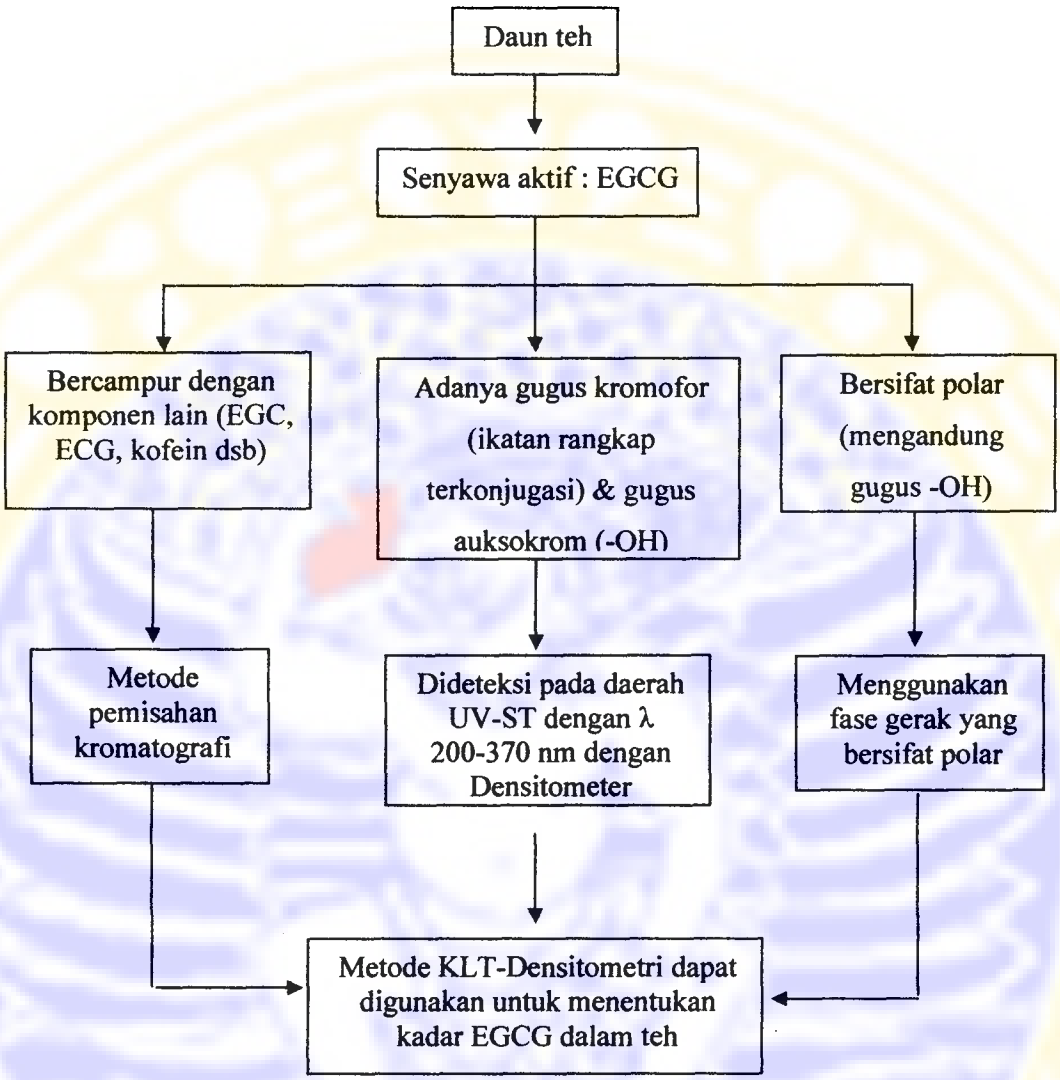
Oleh karena besarnya manfaat EGCG dalam kesehatan, maka diperlukan jaminan mutu terhadap produk-produk yang mengandung EGCG. EGCG yang dikonsumsi oleh masyarakat, diperoleh dalam teh dalam bentuk campuran dengan komponen-komponen lainnya. Untuk itu, diperlukan suatu metode pemisahan EGCG dari komponen-komponen lainnya dalam teh, yang dimungkinkan dengan penggunaan metode kromatografi.

EGCG bersifat polar karena adanya gugus -OH yang terikat pada senyawa aromatik, sehingga untuk mengekstraksi EGCG dalam teh digunakan pelarut pengekstraksi yang bersifat polar, antara lain air panas, kloroform, etil asetat dan lain sebagainya (Kim, 2002). Analisis kualitatif EGCG secara KLT menggunakan fase diam silika gel F 254 dan optimasi fase gerak, diantaranya metanol : air :

asam asetat (0.8:1:0,4), kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (16:1,5:1,5:8) dan kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (8:1:1:4). Pemilihan ini disebabkan karena sifat polar dari EGCG sehingga digunakan fase diam polar dan fase gerak yang lebih non polar.

Analisis kuantitatif dilakukan menggunakan Densitometri dengan melihat noda kromatogram dari EGCG yang mengabsorbsi radiasi UV pada panjang gelombang 200-370 nm (Fried & Sherma, 2003), karena adanya gugus kromofor pada EGCG yaitu ikatan rangkap terkonjugasi pada gugus flavonoid dan adanya gugus auksokrom yaitu -OH yang menempel pada senyawa aromatik.

### 3.2 Bagan Kerangka Konseptual



# BAB IV

# METODE PENELITIAN

## 4.1 Alat dan Bahan

### 4.1.1 Alat

1. Instrumen KLT-Densitometer (SHIMADZU) *Dual-Wavelength Chromato Scanner* CS 930
2. Lampu ultraviolet (CAMAG)
3. Neraca analitik *Direct Reading Micro Balance* (SHIMADZU) LM/20 dengan kepekaan 0,001 mg
4. Neraca analitik (SARTORIUS) BL 210 S dengan kepekaan 0,0001 g
5. Bejana kromatografi
6. Pipa kapiler 10,0 µl (CAMAG)
7. Alat-alat gelas
8. Alat pengering

### 4.1.2 Bahan

1. Standar EGCG p.a (SIGMA)
2. Sampel daun teh
3. Aquadest
4. Metanol p.a (E.MERCK)
5. Kloroform p.a (E.MERCK)
6. Asam asetat p.a (E.MERCK)
7. Asam formiat p.a (E.MERCK)
8. Isopropanol p.a (E.MERCK)
9. Etil asetat p.a (E.MERCK)
10. Lempeng KLT silika gel F 254 (E.MERCK)

## 4.2 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan validasi metode KLT untuk menetapkan kadar EGCG dalam daun teh. Sampel daun teh diperoleh dari perkebunan teh Wonosari-Lawang Jawa Timur, secara *systimatic random sampling*. Artinya

pengambilan sampel pertama dilakukan dengan cara yang sama dengan *simple random sampling* dan untuk sampel selanjutnya ditentukan secara sistematik.

Sampel daun teh dikumpulkan dari unit-unit populasi tiga pucuk utama daun teh dalam keranjang yang telah dipanen oleh petani teh. Selanjutnya diambil 5 unit sampel yang berasal dari 5 keranjang teh dari populasi dengan jumlah 16 unit (16 keranjang). Besar jarak antara sampel satu dengan yang lain diperoleh dari N/n, dimana "N" adalah jumlah unit populasi dan "n" adalah jumlah unit sampel. Dari perhitungan menggunakan rumus di atas didapat besar jarak loncatan kurang lebih 3, misalnya jika sampel pertama jatuh pada nomor 3 maka sampel nomor 2 dan seterusnya akan jatuh pada nomor 6, 9, 12 dan seterusnya sampai diperoleh 5 unit sampel (Zainuddin, 2000)

Sampel daun teh ditetapkan kadar EGCG nya setelah dipreparasi terlebih dahulu. Mula-mula sampel daun teh dimasukkan dalam air panas, tambahkan kloroform dan dikocok. Setelah fase kloroform dibuang ditambahkan etil asetat pada fase air, dan dikocok lalu fase air dibuang dan fase etil asetat diuapkan sampai kering dan setelah itu ditambahkan metanol sampai volume tertentu. Kemudian ditotolkan dalam plat KLT untuk analisis kualitatifnya dan dilanjutkan analisis kuntitatifnya menggunakan Densitometer.

Sebelum digunakan dalam penetapan kadar EGCG harus dilakukan optimasi dan validasi. Optimasi dilakukan pada pemilihan fase gerak dan validasi metode dilakukan dengan penentuan parameter-parameter validasi, yaitu penentuan selektifitas, penentuan batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK), linieritas, akurasi, presisi alat dan presisi metode. Harga dari parameter-parameter validasi tersebut diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan dalam penetapan kadar EGCG dalam ekstrak daun teh.

## 4.3 Tahapan dan Prosedur Penelitian

### 4.3.1 Preparasi Sampel

#### 4.3.1.1 Penentuan Kadar Air

Sampel daun teh yang akan ditetapkan kadar airnya, dipotong kecil-kecil. Setelah itu dimasukkan dan ditimbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg dalam wadah yang telah dipanaskan dan ditimbang hingga konstan. Dikeringkan

pada suhu 105 °C selama 5 jam, kemudian didinginkan dan ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan ditimbang pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Anonim, 1995).

**4.3.1.2. Penyiapan Sampel Daun Teh**

Daun teh terlebih dahulu dicuci dengan air kemudian dilanjutkan pembilasan dengan aquadest, setelah itu ditiriskan atau dikeringkan. Setelah kering, daun teh ditumbuk hingga hancur.

**4.3.1.3 Ekstraksi Daun Teh**

Sampel daun teh yang telah disiapkan, dimasukkan dalam 30,0 ml air panas, saring dan dimasukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 100,0 ml. Ampas daun teh ditambah air panas 30,0 ml, saring dan dimasukkan labu ukur yang sama. Terakhir ampas daun teh ditambahkan lagi air panas 30,0 ml. Kemudian setelah dingin dan ditambahkan aquadest hingga volume 100,0 ml. Dari larutan tersebut diambil 20,0 ml dan dikocok dengan 2 x 15,0 ml kloroform. Setelah itu fase kloroform dibuang. Diteruskan dengan mengambil 15,0 ml fase air dan diekstraksi tiga kali masing-masing dengan 15,0 ml etil asetat. Fase air dibuang, kemudian kumpulkan fase etil asetat dan diuapkan sampai kering, kemudian ditambahkan metanol hingga volume 10,0 ml (Shirai, 1994).

**4.3.2 Validasi Metode**

**4.3.2.1 Selektifitas**

**A. Fase Diam**

Dalam penelitian ini digunakan fase diam plat KLT silika gel F 254.

**B. Pembuatan fase gerak**

Pembuatan fase gerak I : yaitu metanol : air : asam asetat (1:0,8:0,4) dilakukan dengan cara mengambil metanol 6,8 ml, air 5,5 ml dan asam asetat 2,7 ml lalu mencampur ketiganya didalam erlenmeyer tertutup kemudian dituang dalam bejana kromatografi.

Pembuatan fase gerak II : yaitu kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (16:1,5:1,5:8) dibuat dengan cara mengambil kloroform 8,9 ml, asam

asetat 0,8 ml dan asam formiat 0,8 ml. Kemudian mencampur keempatnya dalam erlenmeyer tertutup lalu dituang ke bejana kromatografi.

Pembuatan fase gerak III : yaitu kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (8:1:1:4) yang dibuat dengan mencampur kloroform 8,6 ml, asam asetat 1,1 ml, asam formiat 1,1 ml dan isopropanol 4,3 ml ke dalam erlenmeyer tertutup untuk dihomogenkan terlebih dahulu sebelum dituang ke dalam bejana kromatografi.

Sebelum digunakan proses eluasi berbagai macam komposisi fase gerak di atas, bejana kromatografi perlu dijenuhkan terlebih dahulu. Setelah fase gerak jenuh, ditotolkan standar EGCG dan sampel yang mengandung EGCG kemudian dieluasi sampai garis tanda. Setelah proses eluasi selesai, masing-masing diamati noda yang tampak dan ditentukan Rf nya.

**C. Penentuan Panjang Gelombang Terpilih**

Ditimbang ± 1,0 mg standar EGCG dan ditambahkan volumenya sampai 10 ml, kemudian ditotolkan sebanyak 10,0 µl pada plat kromatografi lapis tipis silika gel F 254. Kemudian dielusi dengan fase gerak terpilih sampai garis tanda. Noda yang diperoleh diamati dengan Densitometer pada panjang gelombang yang memberikan serapan maksimal.

**4.3.2.2 Penentuan Linieritas**

Penentuan linieritas dibuat dengan menimbang standar EGCG ± 2,5 mg dan ± 2,0 mg masing-masing ditambahkan dengan metanol sampai volume 10,0 ml. Pada penimbangan standar ± 2,0 mg dalam 10 ml diencerkan dengan metanol sedemikian sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 64,07 ppm, 80,15 ppm, 96,29 ppm, 120,28 ppm dan dari penimbangan standar ± 2,5 mg dalam 10 ml ditambahkan metanol sampai volume 10,0 ml sehingga diperoleh konsentrasi 250,55 ppm. Masing-masing ditotolkan sebanyak 10,0 µl menggunakan kapiler. Dielusi dengan fase gerak terpilih pada plat KLT, kemudian diukur area noda dengan Densitometer. Dari area tersebut ditentukan koefisien korelasi (r) antara banyaknya EGCG dengan area.

#### 4.3.2.3 Penentuan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Pada plat KLT ditotolkan larutan standar dengan beberapa konsentrasi dengan cara dibuat larutan dengan 5 konsentrasi yang semakin menurun sehingga noda tidak terlihat secara visual pada panjang gelombang 305 nm, yaitu konsentrasi 80,92 ppm, 75,81 ppm, 64,67 ppm, 50,45 ppm dan 25,33 ppm lalu dieluasi dengan fase gerak terpilih, dikeringkan dan dianalisis dengan Densitometer. Batas deteksi ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$C = K\frac{Sb}{Sl}$$

#### 4.3.2.4 Penentuan Akurasi

Dalam penelitian ini, akurasi ditentukan dengan metode adisi. Untuk menghitung prosen rekoveri digunakan sampel dengan kondisi yang sama. Dibuat 3 macam penimbangan sampel ± 1,2537 gram.

Pada tiga penimbangan sampel tersebut masing-masing sampel ditambahkan 30,0 ml air panas, masukkan labu ukur 100,0 ml. Pada ampas ditambahkan 2 x 30,0 ml air panas kemudian dimasukkan dalam labu ukur yang sama dan ditambahkan aquadest sampai volume 100,0 ml. Setelah itu diambil 20,0 ml dan masing-masing ditambahkan adisi standar EGCG sebanyak 1,0 ml 200 ppm, 2,0 ml 160 ppm dan 2,0 ml 200 ppm kemudian dikocok dengan 30,0 ml kloroform. Diambil 15,0 ml kemudian diekstraksi dengan etil asetat 15,0 ml sebanyak tiga kali. Diuapkan sampai kering kemudian ditambahkan metanol dalam labu ukur hingga volume 10,0 ml. Ditotolkan sebanyak 10,0 µl pada plat KLT lalu dielusi dan dilanjutkan dengan analisis dengan Densitometer .

Persen rekoveri ditentukan dengan rumus :

$$\%\,R = \frac{Csp}{Cs} \times 100\,\%$$

Dimana :

% R = Prosen perolehan kembali

Csp = kadar yang didapatkan kembali

Cs = kadar sesungguhnya

#### 4.3.2.5 Penentuan Presisi

**A. Presisi Alat**

Untuk menentukan presisi alat, dibuat larutan dengan penimbangan standar ± 1,0 mg ditambah metanol sampai volume 10,0 ml kemudian ditotolkan sebanyak 10,0 µl dengan replikasi sebanyak sepuluh kali. Kemudian dielusi dan dianalisis dengan Densitometer, dan dihitung rata-rata, harga standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (KV) nya.

**B. Presisi Metode**

Untuk menentukan presisi metode digunakan sampel yang berasal dari tahap akurasi kemudian dihitung SD dan KV nya. Harga koefisien variasi (KV) ditentukan dengan menggunakan rumus :

$$KV = \frac{SD}{\overline{X}} x100\%$$

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X - \overline{X})^2}{N-1}}$$

#### 4.3.3 Penetapan Kadar EGCG dalam Sampel

Sampel daun teh yang telah disiapkan. Ditimbang teliti sebanyak 1,0030 gram dimasukkan dalam 30,0 ml air panas, saring dan dimasukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 100,0 ml. Ampas daun teh ditambah air panas 2 x 30,0 ml, disaring dan dimasukkan kedalam labu ukur yang sama. Didinginkan dan ditambah aquadest sampai volume 100,0 ml. Diambil 20,0 ml dan dikocok dengan 30,0 ml kloroform. Setelah fase kloroform dibuang, diambil 15,0 ml fase air dan diekstraksi tiga kali masing-masing dengan 15,0 ml etil asetat. Fase air dibuang, kemudian dikumpulkan fase etil asetat diuapkan sampai kering, setelah itu, dilarutkan dengan metanol dalam labu 10,0 ml. Ditotolkan pada plat KLT sebanyak 10,0 µl dan dieluasi. Dihitung harga Rf nya, dilanjutkan pengamatan dengan Densitometer untuk melihat area (A) EGCG. Setelah itu dihitung kadar analit dengan memasukan harga A kedalam persamaan garis linier dari kurva liniernya kurva baku. Prosedur yang sama diulangi untuk sampel dengan penimbangan 1,2537 dan 1,5042 gram.

# BAB V

# HASIL PENELITIAN

## 5.1 Uji Selektivitas

Dalam uji selektivitas dilakukan optimasi untuk memisahkan EGCG dengan komponen lain menggunakan beberapa komposisi fase gerak sebanyak 10,0 µl dengan menggunakan plat KLT silika gel F 254.

Hasil KLT dari beberapa fase gerak dapat dilihat pada tabel 5.1 dibawah ini :

Tabel 5.1.1. Harga faktor retardasi (Rf) dari EGCG dari beberapa sistem fase gerak.

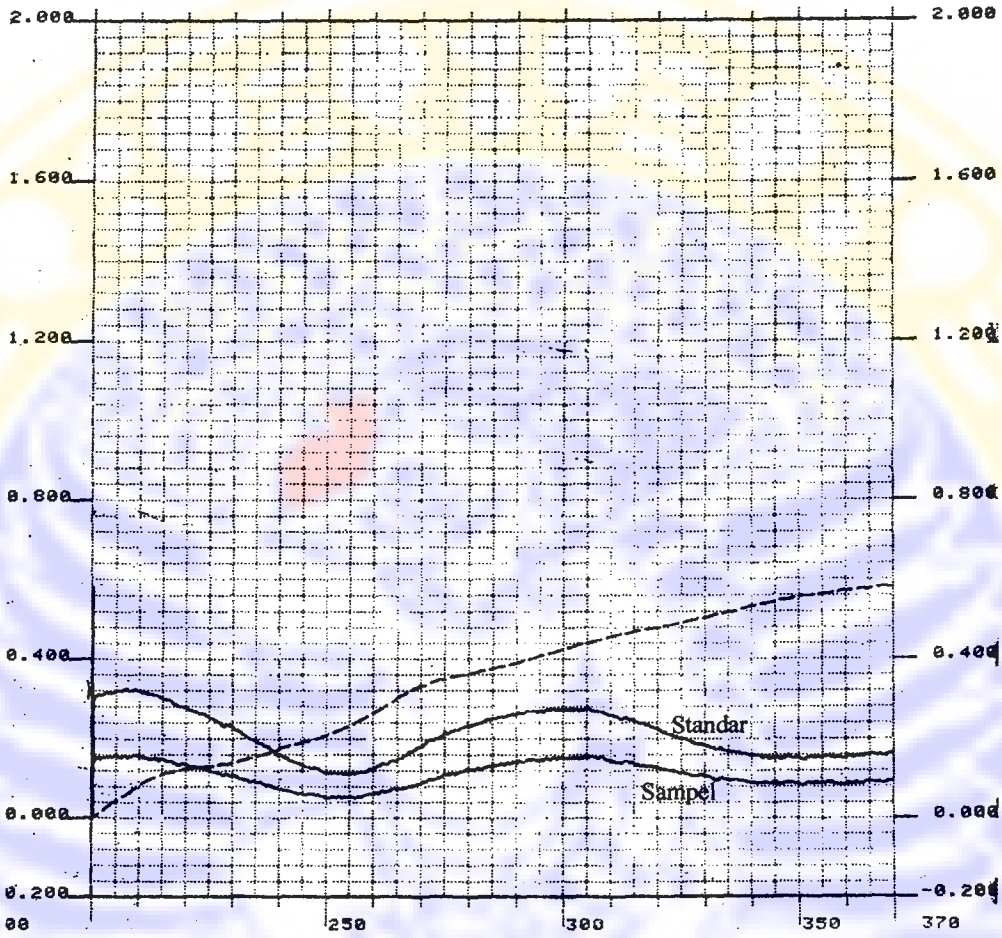
| No. | Sistem Fase Gerak | Harga Rf |
|---|---|---|
| 1. | Metanol : air : asam asetat (1:0,8:0,4) | 0,78 |
| 2. | Kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (16:1,5:1,5:8) | 0,14 |
| 3. | Kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (8:1:1:4) | 0,39 |

Dari hasil yang telah diperoleh di atas, maka sistem fase gerak yang memberikan pemisahan optimal adalah sistem fase gerak dengan komposisi kloroform : asam asetat : asam formiat : Isopropanol (8:1:1:4). Harga Rf pada fase gerak terpilih adalah 0,39 dimana telah memenuhi persyaratan validasi yaitu untuk Rf 0,3-0,8 (Touchstone, 1983) sehingga dapat digunakan untuk analisis selanjutnya.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

## 5.2 Penentuan Panjang Gelombaang Terpilih

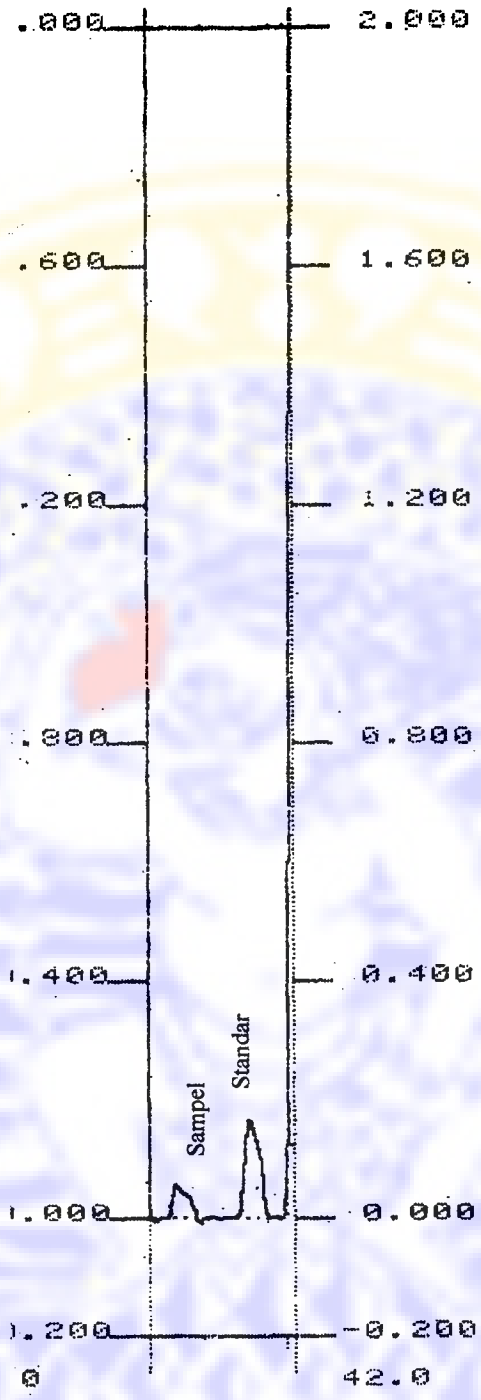
Hasil pengamatan panjang gelombang maksimum EGCG pada panjang gelombang 200-370 nm adalah sebagai berikut :




Gambar 5.1 : Spektra serapan EGCG menggunakan Densitometer dengan fase gerak kloroform:asam asetat:asam formiat:isopropanol (8:1:1: 4).

Pada penentuan panjang gelombang EGCG menggunakan Densitometer (gambar 5.1) terlihat bahwa EGCG memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 305 nm sehingga panjang gelombang ini terpilih untuk analisis EGCG dilakukan pada standar maupun sampel.

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga




Gambar 5.2.2 : Hasil kromatogram sampel dan standar EGCG pada panjang gelombang 305 nm dengan menggunakan KLT-Densitometer

## 5.3 Uji Linieritas

Uji linieritas dilakukan dengan membuat 5 konsentrasi larutan standar. Hasil pengamatan serapan terhadap banyaknya EGCG (µg) pada panjang gelombang 305 nm dapat dilihat pada tabel 5.2

Tabel 5.2 Hasil pengamatan serapan larutan standar EGCG untuk pembuatan kurva linieritas

| Banyaknya EGCG (µg) | Area |
|---|---|
| 0,6407 | 9238,10 |
| 0,8015 | 11843,39 |
| 0,9620 | 13049,17 |
| 1,2028 | 14216,13 |
| 2,5055 | 26120,61 |

r = 0,9966 (r hitung) sedangkan r tabel ($\alpha = 0,05$, n = 4 adalah 0,811)

y = 8731,8271x + 4218.8212

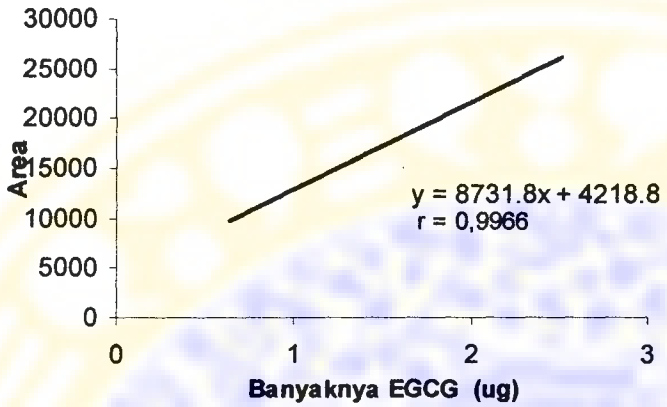
Vxo = 5,83 %

Xp = 0,5511 µg

$Xp < X_1$

Harga r hitung > r tabel berarti terdapat hubungan linier antara EGCG dan luas area dan diperoleh harga Vxo, Xp dan $X_1$ berturut-turut 5,83 %, 0,5511µg dan 0,6407 µg dimana terbukti $Xp < X_1$, sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan antara banyaknya EGCG dan area yang didapat menggunakan metode KLT-Densitometer adalah linier (perhitungan parameter linieritas dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2).

Dari data pengamatan pada tabel 5.2 dibuat kurva linieritas hubungan banyaknya EGCG terhadap area kromatogram EGCG sebagai berikut :




Gambar 5.3 : Kurva linieritas larutan standar EGCG menggunakan metode KLT-Densitometri.

## 5.4 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Dilakukan pengamatan pada larutan standar dengan 5 konsentrasi yang semakin menurun sampai noda tidak terlihat secara visual pada panjang gelombang 305 nm. Terlebih dahulu dilakukan pengamatan pada blanko yang direplikasi sebanyak tiga kali untuk menentukan harga standar deviasi blanko (Sb), kemudian meregresikan banyaknya EGCG dan area untuk mencari harga slope (Sl). Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 5.3 dan 5.4

Tabel 5.3 Penentuan harga Sb

| Banyaknya EGCG (µg) | Area |
|---|---|
| Blanko | 955,418 |
| | 1012,507 |
| | 1138,723 |
| Standar deviasi blanko (Sb) | 93,7997 |

Tabel 5.4 Penentuan harga Sl

| Banyaknya EGCG (µg) | Area |
|---|---|
| 0,2533 | 971,531 |
| 0,5045 | 2610,590 |
| 0,6467 | 3866,512 |
| 0,7581 | 7978,400 |
| 0,8292 | 12887,001 |
| Y = 18448,0139X + 5375,7469 | |
| Slope (Sl) = 18448,0139 | |

Pada tabel 5.3 dapat ditentukan harga Sb dan pada tabel 5.4 terlihat hubungan antara banyaknya EGCG (µg) dan area EGCG maka dapat diperoleh harga Sl, sehingga didapatkan BD = 0,0153 µg dan harga BK = 0,0508 µg (perhitungan BD dan BK dapat dilihat pada lampiran 3).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

**5.5 Akurasi**

Akurasi dilakukan dengan menggunakan metode adisi dengan menambahkan sejumlah larutan standar EGCG, yaitu 1 ml 200 ppm, 2 ml 160 ppm dan 2 ml 200 ppm dimana didapatkan banyaknya EGCG dalam 10,0 µl adalah berturut-turut 0,1429, 0,2182 dan 0,2727 µg (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4). Ketiga macam adisi diatas ditambahkan pada tiga penimbangan sampel ± 1,2537 gram. Hasil akurasi dapat dilihat pada tabel 5.5

Tabel 5.5 Akurasi EGCG pada sampel ekstrak daun teh

| EGCG yang ditambahkan (µg) | Replikasi | Banyaknya EGCG yang sebenarnya (µg) | Rata-rata banyaknya EGCG dalam blanko | % Rekoveri | Rata-rata % rekoveri |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 (Blanko) | 1<br>2 | 1,5069<br>1,5232 | 1,5151 | - | - |
| 0,1429 | 1<br>2 | 1,6239<br>1,6312 | 1,5151 | 76,14<br>81,25 | 78,70 |
| 0,2182 | 1<br>2 | 1,6779<br>1,6783 | 1,5151 | 74,61<br>74,79 | 74,70 |
| 0,2727 | 1<br>2 | 1,7615<br>1,7427 | 1,5151 | 90,36<br>83,43 | 86,90 |
| Rata-rata rekoveri = 80,10 % | | | | | |

Harga akurasi yang didapat adalah 80,10 % yang memenuhi persyaratan validasi yaitu antara 80-120 % (Hartmann, 1994) sehingga dapat digunakan untuk analisis selanjutnya (perhitungan akurasi dapat dilihat pada lampiran 4).

**5.6 Presisi Alat**

Ditimbang EGCG standar ± 1,0 mg dilarutkan dalam 10,0 ml metanol, ditotolkan dan dieluasi kemudian dilakukan pengamatan sebanyak sepuluh kali untuk menentukan koefisien variasi pada alat yang digunakan.

Tabel 5.6 Presisi alat KLT-Densitometer untuk analisis EGCG

| Banyaknya (µg) | Area |
|---|---|
| 1,0040 | 13200,75 |
| 1,0040 | 12702,88 |
| 1,0040 | 13412,07 |
| 1,0040 | 11386,52 |
| 1,0040 | 10857,82 |
| 1,0040 | 13179,23 |
| 1,0040 | 13127,98 |
| 1,0040 | 13001,35 |
| 1,0040 | 13865,80 |
| 1,0040 | 13883,09 |
| Rata – rata | 12861,749 |
| SD | 993,1691 |
| KV | 7,72 % |

Uji presisi alat KLT-Densitometer menunjukkan harga KV 7,72 %, memenuhi persyaratan validasi yaitu KV untuk sampel biologis adalah kurang dari 10 % sehingga harga KV EGCG masih memenuhi persyaratan (Cunif, 1995).

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

### 5.7 Presisi Metode

Pada penentuan presisi metode dilakukan pada sampel hasil akurasi untuk kemudian dicari harga KVnya.

Tabel 5.7 Presisi Metode

| Banyaknya (µg) | Area | SD | Rata-rata | KV(%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 9961,04<br>10024,51 | 44,8801 | 9992,7750 | 0,45 |
| 2 | 10431,96<br>10435,52 | 2,5179 | 10433,74 | 0,02 |
| 3 | 10998,20<br>11162,20 | 115,9655 | 11080,20 | 1,05 |
| | | | Rata-rata KV = 0,51 % | |

Uji presisi metode KLT-Densitometer menunjukkan harga KV 0,51 %, memenuhi persyaratan validasi yaitu KV untuk KLT-Densitometer < 5% (Skoog, 1998) sehingga hasil yang diperoleh dapat digunakan dalam analisis selanjutnya.

### 5.8 Penentapan Banyaknya EGCG dalam Ekstrak Teh

Sebelum analisis menggunakan sampel, ditentukan terlebih dahulu penetapan kadar air sesuai gengan prosedur farmakope IV. Hasil penetapan kadar air adalah 76,07 % (perhitungan lihat di lampiran 6). Pada penetapan kadar dilakukan ekstraksi daun teh pada 3 macam penimbangan sampel. Kemudian dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui banyaknya EGCG yang terdapat pada sampel.

Tabel 5.8 Penetapan kadar EGCG dalam ekstrak teh

| Penimbangan (g) | Perolehan kadar EGCG terhadap berat basah (%) | Perolehan kadar EGCG terhadap berat kering (%) |
|---|---|---|
| 1,0030 | 1,44 | 6,01 |
| 1,2537 | 1,64 | 6,87 |
| 1,5042 | 1,71 | 7,16 |
| Rata-rata | 1,60 | 6,68 |

Dapat dilihat pada tabel 5.8 hasil yang diperoleh pada penetapan kadar EGCG terhadap berat kering adalah 6,68 %, dimana hasilnya lebih kecil dari pustaka yaitu kadar EGCG terhadap berat kering adalah 7,89 % (Hartoyo, 2003). Hal ini dimungkinkan disebabkan oleh perbedaan varietas sampel, perbedaan kadar air pada sampel dan kurang sempurnanya proses ekstraksi (perhitungan penetapan kadar dapat dilihat pada lampiran 5).

# BAB VI

# PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, telah dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif untuk menetapkan kadar EGCG dalam daun teh dengan metode KLT-Densitometri. Sampel daun teh yang diambil dari perkebunan teh Wonosari disederhanakan matrik sampelnya terlebih dahulu dengan dilakukan ekstraksi agar lebih mudah dalam analisis kadarnya.

Sebelum tahap ekstraksi terlebih dahulu ditentukan kadar air yang terserap dalam daun teh segar. Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri sesuai dengan metode standar farmakope tentang penetapan kadar air untuk bahan alam (Anonim, 1995). Hasilnya kadar air yang diperoleh adalah sebesar 76,07 %.

Setelah diketahui kadar air yang terkandung didalam sampel daun teh, kemudian dilakukan penimbangan sampel dengan berat yang telah disesuaikan. Selanjutnya dilakukan proses ekstraksi yang meliputi 3 tahap. Tahap pertama adalah ekstraksi menggunakan air panas untuk melarutkan semua zat-zat pengotor yang larut dalam air panas. Tahap kedua fase air kembali diekstraksi dengan kloroform untuk menarik alkaloid, tannin, lemak dan klorofil. Tahap ketiga adalah ekstraksi dengan menggunakan etil asetat untuk menarik senyawa katekin dimana termasuk EGCG didalamnya.

Pada penetapan kadar EGCG dengan metode KLT-Densitometri ini, digunakan fase diam silika gel F 254 siap pakai karena EGCG dapat memadamkan fluoresens dari plat KLT sehingga noda analit dapat dilihat dibawah lampu UV yang tampak sebagai noda berwarna ungu.

Pada uji selektifitas dilakukan optimasi 3 macam fase gerak, yaitu metanol : air : asam asetat (0.8:1:0,4), kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (16:1,5:1,5:8) dan kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (8:1:1:4) dimana masing-masing fase gerak memberikan harga faktor retardasi (Rf) 0,78, 0,14 dan 0,39. Fase gerak metanol : air : asam asetat (0,8:1:0,4) memberikan harga Rf yang memenuhi persyaratan Rf optimum yaitu 0,3-0,7

(Touchstone, 1983) tetapi menghasilkan noda yang tidak kompak dan *tailing*. Sedangkan fase gerak kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol dengan 2 perbandingan komposisi diatas menghasilkan noda yang kompak, maka berdasar harga Rf dipilih fase gerak kloroform : asam asetat : asam formiat : isopropanol (8:1:1:4) karena memberikan harga Rf yang lebih besar, sehingga pemisahaannya lebih baik.

Berdasarkan spektrum yang diperoleh, maka panjang gelombang terpilih untuk pengukuran EGCG adalah 305 nm. Dipilih panjang gelombang maksimum dari EGCG karena pada panjang gelombang maksimum, dengan adanya sedikit perbedaan jumlah zat yang ditotolkan telah diperoleh hasil respon area yang berbeda sehingga dapat diperoleh hasil yang lebih teliti.

Pada uji linieritas dengan lima macam totolan yang meningkat didapat kan harga koefisien korelasi (r) EGCG 0,9966. Dengan melihat nilai r tersebut dapat dinyatakan bahwa ada korelasi yang linier antara banyaknya EGCG dengan area yang didapat. Hal ini dikarenakan harga r hitung > dari r tabel dimana pada derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) didapat harga r tabel 0,8110.

Parameter lain yang dapat digunakan dalam uji linieritas adalah dengan melihat koefisien variasi dari fungsi (Vxo) dan harga Xp. Harga Vxo EGCG yang diperoleh 5,83 %, belum memenuhi persyaratan umum yaitu sebaiknya lebih kecil dari 5%, namun harga Vxo yang didapat dari penelitian ini merupakan harga terkecil yang didapat sehingga dapat digunakan untuk pengerjaan selanjutnya. Harga Xp EGCG 0,5511 µg lebih kecil dari harga $X_i$ nya yaitu 0,6407 µg dimana telah memenuhi persyaratan bahwa harga $Xp < X_i$. Harga-harga koefisien korelasi tersebut memenuhi persyaratan linieritas sehingga dapat dilakukan perhitungan penetapan kadar pada rentang kadar kurva linieritas dengan membandingkan area sampel terhadap area pembanding atau dengan mengkonversikan area kedalam persamaan regresi kurva linieritas.

Penentuan harga BD dan BK yang dibuat dengan 5 macam totolan yang meningkat, didapat harga BD dan BK masing-masing 0,0153 µg dan 0,0508 µg. Dengan demikian kadar yang ditentukan adalah lebih atau sama dengan BK. Fungsi BK disini adalah untuk menjamin kesahihan data kadar yang didapat.

Artinya apabila kadar yang didapat lebih kecil dari BK menunjukkan bahwa kadar zat tersebut tidak sahih atau valid.

Pada penentuan akurasi EGCG dengan metode adisi, EGCG standar ditambahkan kedalam seduhan daun teh yang telah dihancurkan terlebih dahulu dan diperoleh harga prosen rekoveri sebesar 80,10 % dimana persyaratan akurasi untuk bioanalisis (penetapan hayati / analisis pada matrik sampel biologis) menurut " *Washington Validation on Biologis*" mempunyai rentang prosen rekoveri 80-120 % (Hartmann, 1994) sehingga dapat disimpulkan bahwa pengukuran akurasinya memenuhi persyaratan. Dari proses akurasi diatas dapat ditentukan presisi metode dari EGCG yang dinyatakan dengan harga koefisien variasi (KV). Harga KV yang didapat adalah 0,51 % dimana untuk harga KV secara umum persyaratannya adalah lebih kecil dari 2 % (Gunawan, 1995) tetapi untuk densitometri harga KV lebih kecil dari 5 % dapat dikatakan memenuhi persyaratan (Skoog, 1998) sehingga presisi metode diatas mempunyai harga KV yang memenuhi persyaratan.

Pada penentuan presisi alat, dilakukan dengan menotolkan standar EGCG dengan jumlah dan volume yang sama dan direplikasi sebanyak sepuluh kali. Didapatkan harga KV untuk presisi alat EGCG sebesar 7,72 %. Harga KV ini masih memenuhi persyaratan validasi, karena untuk sampel biologis persyaratan presisi adalah kurang dari 10 % sehingga masih dapat digunakan untuk analisis selanjutnya (Cunif, 1995).

Pada penetapan kadar EGCG dalam sampel dilakukan penimbangan sampel berturut-turut adalah 1,0030 g, 1,2537 g dan 1,5042 g. Setelah dilakukan proses ekstraksi yang sama dengan tahap penentuan akurasi, diperoleh % kadar EGCG dalam sampel terhadap berat basah setelah dikonvers kan dengan prosen rekoverinya 1,60 % dan % kadar terhadap berat keringnya adalah 6,68 %. Berdasarkan pustaka, banyaknya EGCG dalam 100 gram berat kering adalah 7,89 gram (Hartoyo, 2003). Sedangkan dari hasil penetapan kadar di atas didapatkan 6,68 gram EGCG dalam 100 gram berat kering. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan varietas sampel tanaman teh, adanya perbedaan kadar air dalam sampel karena berbedanya waktu pengambilan sampel dan kurang sempurnanya proses ekstraksi sebelum tahap penetapan kadar.

# BAB VII

# KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil validasi metode yang meliputi uji selektifitas (Rf = 0,39), uji linieritas (r hitung = 0,9966, Vxo = 5,83 % dan Xp = 0,5511 µg), penentuan BD dan BK (BD = 0,0153 µg dan BK = 0,0508 µg), presisi alat (KV = 7,72%), presisi metode (KV = 0,51%) dan akurasi (% rekoveri = 80,10%) semuanya telah memenuhi persyaratan validasi.
2. Metode KLT-Densitometri dapat diterapkan untuk penetapan kadar EGCG dalam ekstrak teh.
3. Kadar EGCG dalam 100 gram berat kering daun teh adalah 6,68 %.

## SARAN

1. Metode KLT-Densitometri ini disarankan untuk digunakan pada penetapan kadar EGCG dalam ekstrak teh.
2. Adanya perbedaan kepekaan instrumen kromatografi perlu dilakukan standarisasi EGCG dengan metode KCKT disamping penggunaan metode KLT-Densitometri.

# DAFTAR PUSTAKA


Anonim, 1995. **Farmakope Indonesia**. Edisi IV, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 1033-1036

Anonim, 2002, **The United States Pharmacopeia**. Ed. 25th, Rockville: United States Pharmacopeial, Inc., p. 2256

Anonim, 2003, **Khasiat Teh**. (http://groups.or.id/pipermail/kb/001568.html), diaskes Juli 2004, hal. 3-5

Anonim, 2004. **Intermediate Pharma and Food Additives Extracts of Green Tea Catechins**. (http://www.teabio.com/egcg.htm), diakses 3 Juni 2005, hal. 2-4

Chalimah, S. 2004, **Teh Sebagai Minuman Kesehatan**. (http://rudyct.topcities.com/pop702-71034/siti-chalimah.htm), diakses Desember 2004, hal. 1-2

Cunif, 1995. **Official methods analysis**. Ed. 16th, Vol. 2, Chapter 41, pp.20-22

Dayat, S., 1991, **Inventaris obat**. Edisi I, Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 106

Dunn, W.J., 1986. **Partition Coefficient, Determination and Estimation**. New York: Pergamon Press, pp. 38-39

Fried, B. and Sherma, J., 1994. **Thin Layer Cromatography, Techniques and applicatons**. Ed. 3rd, revised and expanded, New York: Marcel Dekker, Inc.

Fried, B., and Sherma, J., 2003. **Thin Layer Chromatography**. Ed. 3rd, revised and expanded, New York: Marcel Dekker, Inc., p. 14

Fulder, S., 2004, **Khasiat teh hijau**. Jakarta: Prestasi Pustaka Publisher

Gennaro, G., 1995. **Remington's : The Science and Practice of Pharmacy**. Vol. 2, Pennsylavania: Mack Publishing Company, p.1521

Hamilton, R., and Hamilton, S., 1987. **Thin Layer Chromatography**. John Wiley & Sons, pp. 2,13

Hartmann, C., 1994. "**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis of the Washington Conference Report on Bioanalytical Method Validation**" Vol.12, No. 11, Elsevier Science Ltd., London: pp. 1337-1343.

Hartoyo, A., 2003, **Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan**. Yogyakarta: Kanius, hal 11-38

Heftmann, E., 1983. Chromatography Fundamental and Applications of Chromatografic and Electrophoretic Methods, part B : Applications, **Journal of Chromatography Library**. Vol. 226, Elsevier Scientific Publising Company, pp. 416-430

Indrayanto, G., 1994. **Validasi Metode pada Analisis dengan Kromatografi**. Bulletin ISFI Jatim. Vol. 22, No.1., Surabaya: Penerbit BPD-ISFI Jatim, hal 42-50

Indrayanto, G., Yuwono, M., 2003. **Encyclopedia of Chromatography**. New York: Marcel Dekker, Inc., pp.1-2

James, K.C., 1986. **Solubility and Related Properties**. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc., p.281

Khomsan, A., 2003. **EGCG Komponen Bioaktif Untuk Kesehatan**. (http://www.kompas.com/kompas-cetak/030927/ilpeng/586704.htm), diakses 4 Desember 2004, hal. 1-3

Kim, J.I., Hong, S.B., Row, K.H., 2002. **Isolation of Epigallocatechin Gallate from Korean Green Tea**. (http://www.ncbi.nlmnih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=display&db=pubmed), diakses 8 maret 2002, hal. 1-2

Martin, A., 1993. **Physical Pharmacy**. Ed. 4th, Baltimore: Lippincott Williams, pp.239-240

Mulya, M dan Suharman, 1995, **Analisis Instrumental**. Surabaya: Airlangga University Press, hal. 143-147, 223-229

Mulya, M., 1996. **Pengantar Metode Analisis Kromatografi**. Surabaya: University Prees IKIP, hal. 7-14, 71-72

Munson, J.W., 1991, **Ilmu Farmasi dan Obat Analisis Farmasi Metode Modern Terjemahan**. Vol. 11 B, Surabaya: Airlangga University Press

Pecsok, R., Shields, L.D., Cairns, T., William, I.G., 1976. **Modern Methods of Chemical Analysis**. Ed. 2rd, John Wiley and Sons, Inc., p.28

Shirai, T., Sato, A., and Hara, Y., 1994. Epigallocatechin Gallate : The Major Causative Agent of Green Tea-induced asthma. **Chest**. 106 : 1801-1805

Sibuea, P., 2003. **Minum Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan**. (www.sinarharapan.co.id/iptek/kesehatan/2003/1010/kes1.html), diakses 4 Desember 2004, hal. 2

Skoog, D.A., Holler, F.J., and Nieman, T.A., 1998, **Principles of Instrumental Analysis**. Ed. 5th, Philadelphia: Saunders College Publising

Soekardjo, 1997. **Kimia Fisika**. Jakarta: Rineka Cipta, hal.241-247

Stahl, E., 1969, **Thin Layer Chromatography**. Ed. 2nd, New York: Springer Verlag Berlin Heildelberg, pp.687-699

Touchstone, J.C., and Sherma, J., 1979. **Densitometry in Thin Layer Chromatography**. NewYork: John Wiley & Sons, pp.1-33, 475-504

Touchstone, J.C., 1983, **Practice of Thin Layer Chromatography**. 2nd Edition. New York: John Wiley and Sons Inc.

Wahlich, J.C. and Carr, G.P., 1990. A Practical Approach to Method Validation in Pharmaceutical and Analysis, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, pp. 613-626

Zainuddin, M., 2000. **Metodologi Penelitian**. Surabaya: Airlangga University Prees, hal. 79-82

# LAMPIRAN

# LAMPIRAN 1

## Perhitungan Vxo

Harga Vxo standar EGCG

| Banyaknya EGCG (µg) | Area | $\overline{Y}$ i= a + bxi | ( Yi-$\overline{Y}$ i)$^2$ |
|---|---|---|---|
| 0,6407 | 9238,10 | 9813,30 | 330855,04 |
| 0,8015 | 11843,39 | 11217,38 | 391888,52 |
| 0,9620 | 13049,17 | 12618,84 | 185183,91 |
| 1,2028 | 14216,13 | 14721,46 | 255358,41 |
| 2,5055 | 26120,61 | 26096,42 | 585,16 |
| $\overline{X}$ =1,2225 | | | Σ =1163871,04 |

Y= 8731,8272 x + 4218,8212

$$Sy = \sqrt{\frac{\Sigma(Yi - \overline{Yi})^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{1163871,045 - 2}{5-2}} = 622,86$$

$$Sxo = \frac{Sy}{b} \frac{622,86}{8731,8272} = 0,0713$$

$$Vxo = \frac{Sxo}{X} = \frac{0,0713}{1,2225} \text{ x } 100\% = 5,83\%$$

# LAMPIRAN 2

## Perhitungan pembuktian Xp.

Pembuktian Xp EGCG standar

| Banyaknya EGCG (µg) (x) | Area (y) | $X^2$ |
|---|---|---|
| 0,6407 | 9238,10 | 0,4105 |
| 0,8015 | 11843,39 | 0,6424 |
| 0,9620 | 13049,17 | 0,9254 |
| 1,2028 | 14216,13 | 1,4467 |
| 2,5055 | 26120,61 | 6,2775 |
| $\Sigma = 6,1125$<br>$\overline{X} = 1,2225$ | Y = 14893,48 | $\Sigma = 9,7025$ |

$Y = 8731,8272x + 4218,8212$

$Sy = 622,86$

$SXo = 0,0713$

$t_{tabel}\ (0,05; 3) = 2,3534$

$$Q\,xx = \Sigma Xi^2 - \frac{1}{N}(\Sigma Xi)^2$$

$$= 9,7025 - \frac{1}{5}(6,1125)^2$$

$$= 2,23$$

$$Yp = a + Sy\ t_{tabel}\sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{X^2}{Q_{xx}}}$$

$$= 4218,8212 + 622,86\ .\ 2,3534\sqrt{\frac{1}{5} + 1 + \frac{1,2225^2}{2,23}}$$

$$= 6223,4231$$

$$Xp = 2.\ Sxo.\ T_{tabel}\sqrt{\frac{1}{N}+1+\frac{(Yp-Y)^2}{b^2Q_{xx}}}$$

$$= 2.\ 0{,}0713.\ 2{,}3534\sqrt{\frac{1}{5}+1+\frac{(6223{,}4231-14893{,}48)^2}{(8731{,}8272)^2.2{,}23}}$$

Xp = 0,5511

X1 = 0,6407

Jadi $Xp < X_1$

# LAMPIRAN 3

## Perhitungan BD dan BK

Penentuan harga Sb

| Banyaknya EGCG (µg) | Area |
|---|---|
| Blanko | 955,418 |
| | 1012,507 |
| | 1138,723 |
| Standar deviasi blanko (Sb) | 93,7997 |

Penentuan harga Sl

| Banyaknya EGCG (µg) | Area |
|---|---|
| 0,2533 | 971,531 |
| 0,5045 | 2610,590 |
| 0,6467 | 3866,512 |
| 0,7581 | 7978,400 |
| 0,8292 | 12887,001 |
| Y = 18448,0139X + 5375,7469 | |
| Slope (Sl) = 18448,0139 | |

$$BD = 3x\frac{Sb}{Slope} = 3x\frac{93,7997}{18448,0139} = 0.0153\ \mu g$$

$$BK = 10x\frac{Sb}{Slope} = 10x\frac{93,7997}{18448,0139} = 0,0508\ \mu g$$

## LAMPIRAN 4

Contoh perhitungan prosen rekoveri.

- Contoh perhitungan adisi standar EGCG 1,0 ml 200 ppm :

  - Dalam 20,0 ml ekstrak teh = $\frac{1}{21}$ x 200 ppm = 9,52 ppm

  - Dalam 10,0 ml metanol = $\frac{15}{10}$ x 9,52 ppm = 14,29 ppm = 0,1429 µg

- Area blanko 8939,50 dan 9086,20 dimasukkan persamaan regresi y = 8371,8272X + 4218,8212, sehingga masing-masing didapat banyaknya EGCG 1,5069 dan 1,5233 µg. Didapat rata-rata blanko 1,5151 µg.
- Perhitungan untuk sampel dengan adisi 0,2182 µg :

  a. Replikasi I : didapat area 10431,96. Maka banyaknya EGCG 1,6779 µg.

  $$\text{Akurasi} = \frac{1{,}6779 - 1{,}5151}{0.2182} \times 100\ \% = 74{,}61\ \%$$

  b. Replikasi II : didapat area 10435,52. Maka banyaknya EGCG 1,6783 µg

  $$\text{Akurasi} = \frac{1{,}6783 - 1{,}5151}{0{,}2182} \times 100\ \% = 74{,}79\ \%$$

  Rata-rata akurasi pada sampel dengan adisi 0,2182 adalah 74,70 %
- Dengan cara yang sama, diperoleh % rata-rata dari replikasi akurasi untuk sampel dengan adisi 0,1429 dan 0,2727 µg adalah 78,70 dan 86,90 %. Sehingga rata-rata dari % akurasi dari ketiga macam adisi diatas adalah 80,10 %.

## LAMPIRAN 5

### Contoh perhitungan penetapan kadar EGCG dalam sampel

Contoh perhitungan kadar EGCG pada penimbangan sampel 1,2537 g.

Area yang didapat 10916,32, sehingga diperoleh banyaknya EGCG :

- Dalam 10 µl totolan = 2,4757 µg.
- Dalam 10 ml metanol = 2475,7 µg
- Dalam 15 ml etil asetat = 3300,93 µg
- Dalam 100 ml air panas = 20605,0812 µg

$$\text{Kadar terhadap berat kering} = \frac{20605,0812}{1253700} \times 100\ \% = 1,64\ \%$$

$$\text{Kadar terhadap berat basah} = \frac{20605,0812}{1253700} \times 100\ \% = 6,87\ \%$$

## LAMPIRAN 6

Penetapan kadar air

| Berat daun sebelum dikeringkan (g) | Berat daun setelah dikeringkan (g) | Kadar air (%) |
|---|---|---|
| 10,0051 | 2,3668 | 76,34 |
| 10,0024 | 2,4027 | 75,96 |
| 10,0057 | 1,9950 | 80,06 |
| 10,0036 | 2,3792 | 76,22 |
| 10,0054 | 2,4287 | 75,73 |
| | Rata-rata % kadar air | 76,07 % |

Contoh perhitungan kadar air :

Berat air yang hilang setelah pengeringan = 10,0051-2,3668 = 7,6383 g

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{7,6383}{10,0051} \times 100\ \% = 76,34\ \%$$

# LAMPIRAN 7

Tabel r

| DEGREES OF FREEDOM (DF) | 5 PERCENT | 1 PERCENT | DEGREES OF FREEDOM (DF) | 5 PERCENT | 1 PERCENT |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | .997 | 1.000 | 24 | .388 | .496 |
| 2 | .950 | .990 | 25 | .381 | .487 |
| 3 | .878 | .959 | 26 | .374 | .478 |
| 4 | .811 | .917 | 27 | .367 | .470 |
| 5 | .754 | .874 | 28 | .361 | .463 |
| 6 | .707 | .834 | 29 | .355 | .456 |
| 7 | .666 | .798 | 30 | .349 | .449 |
| 8 | .632 | .765 | 35 | .325 | .418 |
| 9 | .602 | .735 | 40 | .304 | .393 |
| 10 | .576 | .708 | 45 | .288 | .372 |
| 11 | .553 | .684 | 50 | .273 | .354 |
| 12 | .532 | .661 | 60 | .250 | .325 |
| 13 | .514 | .641 | 70 | .232 | .302 |
| 14 | .497 | .623 | 80 | .217 | .283 |
| 15 | .482 | .606 | 90 | .205 | .267 |
| 16 | .468 | .590 | 100 | .195 | .254 |
| 17 | .456 | .575 | 125 | .174 | .228 |
| 18 | .444 | .561 | 150 | .159 | .208 |
| 19 | .433 | .549 | 200 | .138 | .181 |
| 20 | .423 | .537 | 300 | .113 | .148 |
| 21 | .413 | .526 | 400 | .098 | .128 |
| 22 | .404 | .515 | 500 | .088 | .115 |
| 23 | .396 | .505 | 1000 | .062 | .081 |

Dikutip dari :

Sudjana, 1995. **Metode Statistika**, Edisi 5, Tarsito, Bandung

# LAMPIRAN 8

## Tabel t

| DEGREES OF FREEDOM (DF) | 5 PERCENT | 1 PERCENT | DEGREES OF FREEDOM (DF) | 5 PERCENT | 1 PERCENT |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | .997 | 1.000 | 24 | .388 | .496 |
| 2 | .950 | .990 | 25 | .381 | .487 |
| 3 | .878 | .959 | 26 | .374 | .478 |
| 4 | .811 | .917 | 27 | .367 | .470 |
| 5 | .754 | .874 | 28 | .361 | .463 |
| 6 | .707 | .834 | 29 | .355 | .456 |
| 7 | .666 | .798 | 30 | .349 | .449 |
| 8 | .632 | .765 | 35 | .325 | .418 |
| 9 | .602 | .735 | 40 | .304 | .393 |
| 10 | .576 | .708 | 45 | .288 | .372 |
| 11 | .553 | .684 | 50 | .273 | .354 |
| 12 | .532 | .661 | 60 | .250 | .325 |
| 13 | .514 | .641 | 70 | .232 | .302 |
| 14 | .497 | .623 | 80 | .217 | .283 |
| 15 | .482 | .606 | 90 | .205 | .267 |
| 16 | .468 | .590 | 100 | .195 | .254 |
| 17 | .456 | .575 | 125 | .174 | .228 |
| 18 | .444 | .561 | 150 | .159 | .208 |
| 19 | .433 | .549 | 200 | .138 | .181 |
| 20 | .423 | .537 | 300 | .113 | .148 |
| 21 | .413 | .526 | 400 | .098 | .128 |
| 22 | .404 | .515 | 500 | .088 | .115 |
| 23 | .396 | .505 | 1000 | .062 | .081 |

Dikutip dari :

Ritchel, W. A., **Handbook of Basic Pharmacokinetics**. 3th ed. Drug Intelligence Publications Inc., Hamilton, p.244.