- PLANT EXTRACTS
- TEA
- [illegible]

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

CHUSNUL CHATIMAH

VALIDASI METODE KLT-DENSITOMETRI PADA PENETAPAN KADAR (-)-*EPIGALLOCATECHIN GALLATE* (EGCG) DALAM TEH HIJAU

FF 124/07
Cha
V

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA

2006

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

A-PDN-Perpustakaan Universitas Airlangga

Lembar Pengesahan

VALIDASI METODE KLT-DENSITOMETRI PADA PENETAPAN KADAR (-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATE (EGCG) DALAM TEH HIJAU

SKRIPSI

Dibuat Untuk **Memenuhi** Syarat
Mencapai Gelar **Sarjana Farmasi Pada**
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

2006

Oleh :

CHUSNUL CHATIMAH
050110099 E

Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama	Pembimbing Serta
Prof. Dr. H. Sugijanto, MS.,Apt.	Drs. A. Toto Poernomo, M.Si.,Apt.
NIP. 130809078	NIP. 131755998

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbilalamiin.., segala puji syukur kepada ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah dan ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **"Validasi Metode KLT-Densitometri pada Penetapan Kadar (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) dalam Teh Hijau"** ini dengan baik.

Selama proses penyusunan skripsi ini, penulis banyak menerima bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. H. Noor Cholis Zaini. Apt., selaku dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti pendidikan program sarjana.
2. Bapak Prof. Dr. H. Sugijanto, MS. Apt., dan Bapak Drs.A. Toto Poernomo, M.Si. Apt., selaku dosen pembimbing yang dengan kesungguhan hati dan kesabarannya memberikan dorongan, nasehat serta semangat selama penelitian berlangsung dan selama penyusunan skripsi ini
3. Bapak Dr. Djoko Agus Purwanto, M.Si. Apt., Ibu Dra. Hj Andjar Sardjimah, Ms., Prof. Dr. Siswandono, MS. Apt., Drs. Bambang Tri P, Ms., dan Dr. Hadi Poerwono, M.Sc yang banyak membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Drs. H. Harjana, M.Sc., dan Ibu Prof. Dr. Tutuk Budiati, MS selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan hingga terselesaikannya skripsi ini.
5. Ibu Ir. Hj Rully Susilowati, Ms selaku dosen wali yang penuh pengertian memberikan do'a, nasehat dan semangat selama belajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga serta bantuannya dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Ayah Ichsan Harris, Mama Elida Ufny dan Adikku Haidar serta seluruh keluargaku, yang telah memberikan doa yang tulus, semangat dan dorongan selama pendidikan hingga terselesaikannya skripsi ini.

7. Abang Ipan tersayang yang selalu memberikan do'a, semangat dan bantuannya hingga terselesaikannya skripsi ini.
8. Seluruh staff pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bekal ilmu yang diberikan selama ini.
9. Kepala dan staf karyawan laboratorium multi purpose I atas segala kerjasamanya dalam terselesaikannya skripsi penulis.
10. Kepala Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga, terima kasih telah memberikan izin untuk menggunakan fasilitas laboratorium dalam menyelesaikan skripsi penulis.
11. Karyawan laboratorium Analisis Farmasi Pak Khusairi, Pak Haryono, Pak Dasuki, Pak Bambang ruang baca KF, Mas Gunarso, Mas Roy dan Mas Fahrizal atas semua bantuan waktu dan tenaga selama penyelesaian skripsi ini.
12. Sahabatku Zen dan Nina atas bantuan, kerjasama dan semangatnya.
13. Temen-temenku Ribka, Ripi, Meti, Mba Desy, Mba Nopi imut, Mas Bona, Dani, Asri, Titin, Ika, Dewi, Virly, Yurika dan adik-adik kos Darmawangsa VII Melly, Fika, Nita atas kerjasama, perhatian dan bantuannya, serta temen-temen angkatan 2001 yang tidak dapat disebutkan satu per satu atas semangatnya pada penulis.

Kesempurnaan ini Hanyalah milik ALLAH SWT dan kebenaran itu pun datang dari-Nya. Semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu pengetahuan dalam bidang kefarmasian bagi masyarakat luas pada umumnya.

Surabaya, September 2006

Penulis

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

RINGKASAN

Teh (*Camellia sinensis L.*) mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan. Daun teh hijau banyak mengandung senyawa polifenol dalam kadar yang tinggi antara lain derivat *catechin* yaitu *epicatechin* (EC), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG) dan *epigallocatechin gallate* (EGCG). Komponen bioaktif yang paling dominan adalah EGCG yang merupakan antioksidan kuat berperan dalam melawan radikal bebas yang sangat berbahaya bagi tubuh. Banyaknya manfaat EGCG bagi kesehatan dan pentingnya jaminan mutu atau kualitas yang sampai pada masyarakat, diperlukan suatu metode analisis yang dapat memisahkan EGCG dari komponen yang lainnya dalam matrik teh. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk analisis EGCG adalah KLT-Densitometri yang analisisnya dapat dilakukan secara sederhana, *reprodusibel* dan relatif murah dibandingkan dengan metode KCKT.

Pada metodologi penelitian dilakukan uji kualitatif, validasi metode analisis KLT-Densitometri yang meliputi uji selektifitas, linieritas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi.

Fase diam yang digunakan adalah silika gel F 254 dan fase gerak terpilih adalah kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8). Panjang gelombang terpilih berdasarkan spektrum absorban-reflektan untuk penetapan kadar EGCG menggunakan Densitometer adalah 278 nm. Pada uji linieritas, koefisien korelasi (r) hitung (0,9996) lebih besar dari r tabel (0,878) dan Vxo = 3,94% memenuhi persyaratan (syarat Vxo < 5%), sehingga dapat disimpulkan bahwa didapat hubungan yang linier antara banyaknya EGCG (µg) terhadap area EGCG. BD untuk EGCG 0,0188 µg, sedangkan BK 0,0627 µg. Untuk akurasi diperoleh persen rekoveri 91,41%, dimana persyaratan akurasi yang dapat diterima untuk sampel biologis adalah 80-120% (Carr & Wahlich, 1990). Pada presisi metode diperoleh harga KV=7,01%, dan pada presisi untuk standar EGCG diperoleh KV = 4,47%, dimana syarat presisi untuk sampel biologis yang dapat diterima adalah < 10% (Curniff, 1995).

Dari hasil penelitian, disimpulkan bahwa metode KLT-Densitometri dapat diterapkan untuk penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau yang beredar, dan diharapkan dapat memberikan data atau informasi tentang metode alternatif yang dapat dilakukan standarisasi terhadap produk teh hijau yang beredar. Pada penerapan metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau diperoleh rata-rata kadar EGCG = (3,33 ± 0,08)%.

ABSTRACT

The Determination of EGCG in Green Tea product using Thin Layer Chromatography-Densitometry

A simple TLC-Densitometry methode has been developed for the determination of (-)-Epigallocatechin gallate in green tea product. This methode uses silica gel F 254 as a stationer phase and chloroform-acetic acid-formic acid-isopropanol (16:2:2:8) as a mobile phase. The maximum wavelength was detected at 278 nm. Linearity respon was found (-)-Epigallocatechin gallate between 0,5043 μg–2,5215 μg with regression of equation Y = 5409,8 X – 569,97 (r = 0,9996; Vxo= 3,94%). The methode was validated to determine the limit detection (0,0188 μg), limit quantitation (0,0627μg), accuracy (91,41%), precission for EGCG standart (4,47%) and precission of methode (7,01%). These results demonstrate that EGCG in green tea products can be detected by TLC-Densitometry method. By using method of TLC-Densitometry, EGCG concentration in green tea products is (3,33 ± 0,08)%.

Keyword : (-)-Epigallocatechin gallate, EGCG, tea, TLC-Densitometry, validation

DAFTAR ISI

		Halaman
HALAMAN JUDUL		i
LEMBAR PENGESAHAN		ii
KATA PENGANTAR		iii
RINGKASAN		v
ABSTRAK		vi
DAFTAR ISI		vii
DAFTAR GAMBAR		x
DAFTAR TABEL		xi
DAFTAR LAMPIRAN		xii
BAB I	**PENDAHULUAN**	1
	1.1 Latar Belakang Masalah	1
	1.2 Rumusan Masalah	3
	1.3 Tujuan Penelitian	3
	1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II	**TINJAUAN PUSTAKA**	4
	2.1 Tinjauan Tentang Tanaman Teh	4
	2.2 Jenis dan Karakteristik Teh	4
	2.2.1 Teh Hijau	4
	2.2.2 Teh Oolong	5
	2.2.3 Teh Hitam	5
	2.2.4 Manfaat Tanaman Teh	6
	2.3 Tinjauan Tentang EGCG	7
	2.4 Tinjauan Tentang Ekstraksi EGCG	7
	2.5 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	9
	2.5.1 Prinsip Pemisahan Pada KLT	9
	2.5.1.1 Faktor Selektivitas (α)	10
	2.5.1.2 Resolusi (RS)/Derajat Keterpisahan	11
	2.5.2 Teknik Penampakan Noda	11

2.6 Tinjauan Tentang Densitometri 12
2.6.1 Analisis Kualitatif dengan KLT - Densitometri..... 14
2.6.2 Analisis Kuantitatif dengan KLT - Densitometri..... 14
2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode..... 14
2.7.1 Selektivitas..... 14
2.7.2 Linearitas..... 15
2.7.3 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)..... 15
2.7.4 Akurasi dan Presisi Metode 16
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL..... 17
3.1 Uraian Kerangka Konseptual..... 17
3.2 Bagan Kerangka Konseptual 19
BAB IV METODE PENELITIAN 20
4.1 Bahan 20
4.2 Alat 20
4.3 Validasi Metode Analisis..... 20
4.3.1 Selektivitas..... 20
4.3.1.1 Pembuatan Larutan Baku Induk EGCG..... 20
4.3.1.2 Penyiapan Fase Diam dan Fase Gerak..... 21
4.3.1.3 Penentuan Panjang Gelombang (λ) Terpilih..... 21
4.3.1.4 Ekstraksi EGCG dalam Produk Teh Hijau.. 21
4.3.1.5 Penentuan Faktor Retardasi (Rf), Faktor Selektivitas (α) dan Derajat Keterpisahan/Resolusi (Rs)..... 23
4.3.2 Linearitas..... 23
4.3.3 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)..... 24
4.3.4 Penentuan Akurasi dan Presisi Metode..... 25
4.3.5 Penetapan Kadar EGCG dalam Produk Teh Hijau ... 26

BAB V HASIL PENELITIAN 28
5.1 Validasi Metode Analisis 28
5.1.1 Selektifitas 28
5.1.1.1 Pembuatan Larutan Baku Induk EGCG 28
5.1.1.2 Penentuan Fase Gerak Terpilih 28
5.1.1.3 Penentuan Panjang Gelombang Terpilih 30
5.2 Linieritas 31
5.3 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)... 32
5.4 Penentuan Presisi Standar EGCG 33
5.5 Penentuan Akurasi dan Presisi Metode..... 34
5.6 Penetapan Jumlah EGCG dalam Produk Teh Hijau 36
BAB VI PEMBAHASAN 38
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN 41
DAFTAR PUSTAKA..... 42

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Struktur Kimia Epigalokatekin Galat	7
3.2	Kerangka Konseptual EGCG dalam Teh Hijau dengan Metode KLT-Densitometri	19
5.1	Hasil Eluasi beberapa macam Fase Gerak	29
5.2	Spektrum Absorban-Reflektan Standar EGCG dan Sampel Produk Teh Hijau Dengan Pengukuran menggunakan Densitometri CS 930	30
5.3	Kurva Hubungan antara banyaknya EGCG (µg) terhadap Area EGCG untuk Linieritas	31
5.4	Kurva Hubungan antara banyaknya EGCG (µg) terhadap Area EGCG untuk Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	32
5.4	Hasil Eluasi Penentuan Akurasi dan Presisi EGCG	35

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
V.1	Hasil Pengamatan Harga Rf, Rs dan α beberapa macam fase gerak.....	28
V.2	Hasil Pengamatan Linieritas	31
V.3	Hasil Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	32
V.4	Pengamatan Serapan Blanko	33
V.5	Hasil Penentuan Presisi untuk Standar EGCG	34
V.6	Hasil Pengamatan Linieritas untuk Akurasi	35
V.7	Hasil Penentuan Akurasi dan Presisi Metode EGCG dalam Produk Teh Hijau.....	36
V.8	Penetapan Jumlah EGCG dalam Produk Teh Hijau	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1.	Perhitungan Faktor Selektivitas (α) dan Rs	45
2.	Perhitungan Koefisien Variasi fungsi (Vxo)	46
3.	Perhitungan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	47
4.	Perhitungan Persen Rekoveri dan Presisi Metode	48
5.	Perhitungan Penetapan Kadar EGCG dalam Produk Teh Hijau	49
6.	Gambar Kromatogram Linieritas	50
7.	Gambar Kromatogram Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi	51
8.	Gambar Serapan Blanko untuk Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)	52
9.	Gambar Kromatogram Akurasi dan Presisi Metode.....	53
10.	Gambar Kromatogram linieritas untuk Akurasi dan Presisi Metode	54

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Teh merupakan salah satu minuman yang sangat populer, banyak diminati masyarakat didunia. Teh berasal dari tanaman perdu *Camellia sinensis* suku "*Theaceae*", yang memiliki rasa dan aroma yang khas. Dibeberapa negara Asia seperti Cina dan Jepang, teh merupakan minuman sehari-hari dan banyak disukai. Daun teh mengandung tiga komponen penting yang mempengaruhi mutu minuman yaitu kafein yang memberikan efek stimulant, tannin yang memberi kekuatan rasa dan polifenol yang memiliki banyak khasiat untuk kesehatan (Hartoyo, 2003).

Senyawa polifenol pada teh hijau memiliki kadar yang tinggi antara lain : *catechin* (C) 0,08%, *epicatechin* (EC) 0,41%, *epigallocatechin* (EGC) 0,39%, *epicatechin gallate* (ECG) 0,65% dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) 3,28%. Komponen bioaktif yang paling dominan adalah EGCG. EGCG dalam teh hijau banyak berkhasiat bagi kesehatan salah satunya dapat sebagai antioksidan kuat dan sebagai antikarsinogenik (Hartoyo, 2003).

Polifenol teh hijau juga dapat mencegah terjadinya kanker dibandingkan polifenol teh hitam (Fulder, 2004). Teh hijau telah banyak dikonsumsi masyarakat dimana diketahui bahwa kandungan EGCG dari teh hijau paling banyak memberikan manfaat bagi kesehatan, oleh sebab itu perlu adanya dikembangkan metode yang valid untuk menetapkan kadar EGCG dalam produk teh hijau.

Dalam produk teh hijau, dijumpai banyak komponen-komponen lain selain golongan katekin. Diantaranya adalah golongan alkaloid yaitu: xantin, teophyillin, teobromin, tearubigin, kafein, minyak atsiri dan fluorid. Oleh karena itu dibutuhkan metode untuk memisahkan EGCG dari komponen yang lainnya. Metode yang banyak digunakan untuk pemisahan suatu campuran zat dalam suatu sampel biologis adalah metode kromatografi. Teknik kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan fisik suatu campuran zat kimia dalam suatu komponen campuran yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh pergerakan fase gerak.

Pada penelitian sebelumnya, metode yang digunakan untuk analisis EGCG adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan menggunakan kolom RP C-18 dan fase gerak metanol-asam asetat-air (20:75:5) (Sakata *et al.*,1991). Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dengan metode KLT-Densitometri, yang mana sampai saat ini belum ditemukan validasi penetapan kadar EGCG yang terdapat dalam teh hijau secara KLT-Densitometri tersebut. Disamping itu belum ditemukan adanya standarisasi EGCG dalam produk teh hijau, padahal kandungan EGCG tersebut memiliki banyak khasiat untuk kesehatan masyarakat. Teknik kromatografi dengan KLT-Densitometri merupakan suatu teknik pemisahan yang popular, lebih mudah dilaksanakan, sederhana dan biaya yang relatif lebih murah daripada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) serta merupakan metode alternatif yang dapat digunakan selain metode KCKT (Fried & Sherma, 1994).

Dilihat dari strukturnya, EGCG dalam teh hijau ini bersifat polar dimana memiliki gugus auksokrom yaitu gugus OH (hidroksil) yang terikat pada cincin aromatis dan gugus kromofor yaitu ikatan rangkap terkonyugasi yang akan menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 270 nm. Maka dapat dideteksi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Wu *et al.*, 2000).

Berdasarkan polaritas dari EGCG, maka fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254 yang stabil terhadap eluen dengan kandungan air yang cukup tinggi (Kantasubrata, 1991). EGCG merupakan polifenol, dimana untuk golongan ini pada umumnya fase gerak yang dipakai adalah metanol-asam-asetat:air (19:1:1) (Heftmann, 1983), metanol-asam asetat-air (20:5:75) (Sakata *et al.*, 1991), kloroform-metanol-air (65:35:10) (Amarowicz, 2003), kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8) (Zulkarnain, 1997) dan kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8). Dari hasil eluasi dengan menggunakan fase gerak-fase gerak tersebut, maka akan di cari fase gerak yang sesuai yang dapat memisahlan EGCG dari kandungan-kandungan yang lainnya.

Menurut USP XXIV NF 19 (2000) Validasi metode dengan KLT-Densitometri meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi. Metode ini akan diterapkan untuk menetapkan kadar EGCG dalam salah satu produk teh hijau.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah diatas, maka yang menjadi rumusan masalah adalah :

a. Apakah penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau menggunakan KLT-Densitometer dapat digunakan sesuai dengan ketentuan menurut persyaratan validasi metode yang meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi.
b. Mencari metode baru yaitu dengan KLT-Densitometri, dimana pada penelitian sebelumnya untuk analisis EGCG dalam produk teh hijau digunakan secara KCKT.

1.3 Tujuan Penelitian

a. Menentukan fase gerak yang dapat memisahkan EGCG dari komponen-komponen yang lainnya secara optimal dengan harga Rf, Rs dan α yang memenuhi persyaratan (Rf = 0,2-0,8; Rs > 1,5 dan $\alpha > 1$).
b. Melakukan uji validasi metode KLT-Densitometri yang meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi untuk penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau.
c. Menetapkan kadar EGCG dalam suatu produk teh hijau.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau adalah:

a. Mengembangkan metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau.
b. Mendapatkan metode penetapan kadar yang memenuhi syarat validasi yang terstandar, sehingga dapat dikembangkan untuk penetapan kadar produk teh hijau di pasaran.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang Tanaman Teh (*Camellia sinensis*)

Tanaman teh dapat tumbuh didaerah tropis dan sub tropis. Tanaman teh dapat tumbuh baik didataran tinggi dan pegunungan yang berhawa sejuk sekitar 14-25^{0}C. Tanaman teh umumnya diperkebunan dipanen secara manual, dan dapat tumbuh pada ketinggian 200-2.300 m dpl. Curah hujan rata-rata 2500-3500 mm per tahun baik untuk tanaman teh dan curah hujan minimum adalah 1150-1400 mm per tahun. Tanaman ini sangat tidak tahan terhadap daerah yang panas dan kering. Tanah yang berdrainase baik dan kaya akan unsur hara cocok untuk perkebunan teh. Tanah yang berbatu dan telah mengalami erosi kurang baik untuk ditanami teh (Muljana, 1993).

2.2 Jenis dan Karakteristik Teh

Berdasarkan cara pengolahannya, dikenal tiga jenis teh yaitu teh hijau (teh tanpa fermentasi), teh oolong (teh semifermentasi) dan teh hitam (teh fermentasi) (Hartoyo, 2003).

2.2.1 Teh Hijau

Teh hijau merupakan teh yang tidak mengalami proses fermentasi. Teh hijau mengandung (+) *catechin* 0,08%, (-) *epicatechin* (EC) 0,41%, (-) *epigallocatechin gallate* (EGC) 0,39%, (-) *epicatechin gallate* (ECG) 0,65%, dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) 3,28% berat kering (Hartoyo, 2003).

Teh hijau didapatkan dari pelayuan daun teh setelah dipetik dengan tujuan menginaktifkan enzim oksidase dan mengurangi kadar air daun sehingga mudah digulung, kemudian penggulungan ini berguna untuk pengeluaran senyawa alami dan aroma selama penteduhan. Selanjutnya pengeringan daun, dimana daun teh kering berwarna hijau kehitaman, dan keharuman serta warnanya tetap terjaga. Proses terakhir adalah sortasi yang bertujuan untuk memisahkan partikel bukan teh (seperti tangkai, serat, pasir dan benda-benda asing lainnya) serta untuk

mendapatkan teh hijau dan menggolongkannya dalam jenis mutu tertentu sesuai dengan standar (Hartoyo, 2003).

2.2.2 Teh Oolong

Teh oolong merupakan teh semi fermentasi. Teh oolong mengandung (+) *catechin* 0,14%, (-) *epicatechin* (EC) 0,28%), (-) *epigallocatechin* (EGC) 2,74%, (-) *epicatechin gallate* (ECG) 0,43%, dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) 3,14% berat kering (Hartoyo, 2003).

Teh oolong merupakan gabungan teh hitam dan teh hijau. Teh tersebut difermentasi dengan cepat, sesudah dan sebelum penggulungan. Pencampuran teh hijau dan teh hitam ini bertujuan untuk memperoleh komposisi teh yang homogen dan mendapatkan mutu teh yang sesuai dengan selera konsumen. Kemudian dilanjutkan dengan proses penggosongan dan pemanasan yang bertujuan untuk menghilangkan bau asing serta mengurangi rasa sepat dan pahit. Selanjutnya proses pelembapan dan pencampuran bunga yang bertujuan untuk memaksimalkan penyerapan bau bunga, menjaga agar kondisi bunga tetap segar secara fisiologis melepaskan bau harumnya. Terakhir yaitu proses pengeringan yang ditujukan untuk mengurangi kadar air serta untuk memperpanjang mutu pada saat penyimpanan.

2.2.3 Teh Hitam

Teh hitam merupakan teh yang mengalami proses fermentasi. Teh hitam mengandung (+) *catechin* 0,23%, (-) *epicatechin* (EC) 0,27%, (-) *epigallocatechin* (EGC) 4,24%, (-) *epicatechin gallate* (ECG) 1,03%, dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) 1,25% berat kering (Hartoyo, 2003).

Teh hitam pada proses pengolahannya dimulai dengan pelayuan selama 10-16 jam. Proses ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dalam daun, sehingga daun mudah digulung dan dihancurkan, memperbesar konsentrasi polifenol serta membentuk calon aroma teh. Kemudian proses penggulungan dan oksidasi polifenol. Proses ini bertujuan untuk mengecilkan ukuran partikel daun agar sesuai dengan ukuran partikel teh, mempercepat proses oksidasi polifenol. Kemudian dilanjutkan dengan proses pengeringan yang bertujuan untuk

menghentikan aktivitas enzim serta dapat memperpanjang kualitas mutu pada saat penyimpanan (Hartoyo, 2003).

2.2.4 Manfaat Tanaman Teh

Dalam daun teh mengandung tiga komponen penting yaitu kafein yang memberikan efek stimulan, tannin yang memberi kekuatan rasa, dan polifenol. Komponen bioaktif yang paling dominan dalam teh hijau adalah EGCG (*epigallocatechin gallate*) yang bermanfaat tinggi bagi kesehatan. Sebagai antioksidan yang kuat, EGCG mempunyai kemampuan mengusir radikal bebas, berfungsi sebagai antikarsinogenik, antimutagenik, antimikrobial, melindungi kulit dari sinar UV, mengahambat peroksidasi lipid, menurunkan kadar kolesterol dalam darah, serta dapat mencegah penyakit jantung koroner, stroke dan caries pada gigi (Hartoyo, 2003).

Selain itu, kandungan epigalokatekin (EGC) dan epigalokatekin galat (EGCG) pada teh hijau dapat menghambat aktivitas enzim yang mengatur tekanan darah dan dapat membantu mengurangi penyerapan vitamin B1 yang mengakibatkan berkurangnya aktivitas metabolisme gula sehingga berat badan pun bisa turun. Maka dengan mengkonsumsi teh secara teratur, dua sampai empat gelas setiap hari dapat menstimulasi terjadinya penurunan tekanan darah dan membantu menormalkan tekanan darah pada penderita tekanan darah tinggi (Fulder, 2004).

Teh mengandung fluorid yang dapat menjaga kesehatan mulut dan mencegah mengurangi virus pada rongga mulut dan bakteri berbahaya yang dapat menyebabkan sakit gusi dan karang gigi. Fluorid pada teh juga mampu menguatkan email gigi. Antioksidan pada teh juga bermanfaat untuk membantu menurunkan tingkat gula darah, memperlambat proses penuaan hal ini dikaitkan dengan kerja antioksidan yang terdapat pada teh hijau. Antioksidan pada teh juga dapat memperlancar peredaran darah, meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah timbulnya infeksi, dapat melangsingkan tubuh, mencegah keracunan makanan, serta dapat mengobati penyakit batu ginjal (Fulder, 2004).

2.3 Tinjauan Tentang EGCG

Komponen utama dari teh hijau adalah polifenol yang dikenal memiliki khasiat antioksidan dan antimutagenik. Polifenol terdapat sebagai komplek bersama tanin dimana tanin secara luas terdistribusi pada sebagian besar tanaman dan hampir setiap suku tanaman memilikinya. Komponen polifenol terbesar adalah EGCG. EGCG mempunyai sinonim yaitu (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxy-phenyl)-3-4dihydro-1(2,H)-benzopyran-3,5,7-triol- 3-(3,4,5-trihidroxy benzoate), -(-)-Epigallocatechin gallate, Epigallokatekin 3-O-gallate

Rumus kimia : $C_{22}H_{18}O_{11}$

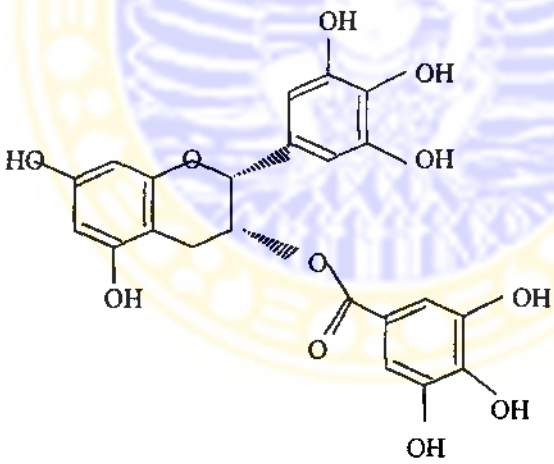
Berat molekul : 458,38

Pemerian : serbuk putih

Kelarutan : sangat mudah larut dalam air (1 :0,2)

Penyimpanan : stabil pada temperatur kamar dan penyimpanan pada tempat yang kering, bebas udara dan cahaya sedikitnya 2 tahun

Titik lebur : 218 ^{0}C



Gambar 2.1 Struktur Kimia (-)-Epigallokatekin galat (Budavari, 1996).

2.4 Tinjauan Tentang Ekstraksi EGCG

Ekstraksi adalah proses pemisahan dimana suatu zat terlarut didistribusikan diantara 2 pelarut 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 pelarutan dan prosedur tertentu (Anonim, 1970).

Proses ekstraksi didasarkan pada prinsip bahwa jika kedalam suatu sistem yang terdiri dari dua cairan yang tidak saling campur ditambahkan zat padat yang dapat larut dalam kedua cairan tersebut, maka zat tersebut akan terbagi dalam perbandingan yang tetap pada suhu tertentu.

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 dengan pelarut kedua pada suhu yang sama. Harga Kd berubah sedikit dengan naiknya konsentrasi. Harga Kd juga berubah dengan perubahan temperatur. Harga Kd tergantung jenis pelarut dan zat terlarutnya (Pecsok, 1976).

Dalam melakukan ekstraksi, volume tiap kali ekstraksi juga sangat berpengaruh serta banyaknya ekstraksi yang dilakukan. Sehingga semakin banyak ekstraksi dilakukan , maka ekstraksi solut semakin sempurna (Martin, 1993).

Untuk memperoleh EGCG, maka akan dilakukan proses preparasi sampel produk teh hijau terlebih dahulu. Ditimbang teliti sampel produk teh hijau, dimasukkan dalam air panas (± 80-90^{0}C) dalam beker gelas, kemudian didiamkan selama 30 menit, setelah itu disaring dengan kertas saring dan dimasukkan dalam labu ukur. Kemudian larutan tersebut diekstraksi dengan kloroform untuk menarik alkaloid dan tannin, setelah itu fase air diekstraksi lagi dengan etil asetat sama banyak untuk menarik golongan katekin, hal ini diulang sebanyak tiga kali. Setelah itu fase air dibuang, kemudian fase etil asetat ditampung dalam cawan porselen dan diuapkan dalam lemari asam sampai kering. Hasil yang diperoleh dilarutkan dengan metanol, larutan ditotolkan sebanyak 10 µL, dieluasi dengan fase gerak terpilih, kemudian noda yang diperoleh diamati menggunakan Densitometer (Shirai *et al.*, 1994).

2.5 Tinjauan Tentang Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh pergerakan fase mobil (Mulya & Suharman, 1995).

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu cara yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam suatu campuran pada lempeng kromatografi (Fried & Sherma, 1994). Aktivitas dari fase diam ditentukan oleh permukaannya, sifat kimia dan susunan geometris atom-atom penyusun permukaan fase diam tersebut (Hamilton & Hamilton., 1987).

Fase gerak merambat (migrasi) pada fase diam karena gaya kapilaritas, terkadang juga dibantu oleh gaya gravitasi dan tekanan. Pada pemisahan komponen dengan KLT, tiap komponen mempunyai waktu migrasi total yang sama tetapi berbeda dalam jarak migrasi yang ditempuh. Fase gerak pada KLT dapat menggunakan pelarut tunggal maupun pelarut organik atau anorganik. Pemilihan fase gerak sangat dipengaruhi oleh macam dan polaritas zat-zat kimia yang akan dipisahkan (Fried & Sherma, 1994).

EGCG merupakan polifenol dari flavonoid, dimana fase gerak dengan KLT umumnya yang digunakan adalah metanol-asam asetat-air (20:5:75) (Sakata *et al.*, 1991), kloroform-metanol-air (65:35:10) (Amarowicz, 2003), kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8) (Zulkarnain, 1997) dan kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254.

2.5.1 Prinsip Pemisahan Pada KLT

Mekanisme proses pemisahan pada KLT ada beberapa macam yaitu adsorpsi, partisi, pertukaran ion, filtrasi/permeasi dan elektroforesis. Dalam KLT pemisahan komponen campuran terjadi pada fasa diam dan fasa gerak. Pemisahan komponen-komponen dalam KLT dapat terjadi jika salah satu komponen dalam campuran lebih kuat diadsorpsi oleh fasa diam daripada komponen lain dalam campuran.

Kemampuan komponen untuk terdistribusi dalam fasa diam dan fasa gerak tergantung pada konstanta yang disebut koefisien distribusi atau koefisien partisi (K), dimana harga K adalah (Fried & Sherma, 1994) :

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

Keterangan : Cs = konsentrasi solut dalam fasa diam

Cm = konsentrasi solut dalam fase gerak

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada KLT adalah harga Rf yaitu hasil bagi jarak migrasi komponen dengan jarak migrasi fase gerak (Skoog, 1998) :

$$Rf = \frac{\text{jarak migrasi komponen}}{\text{jarak migrasi fase gerak}} = \frac{dR}{dM}$$

Faktor-faktor yang paling menentukan harga Rf adalah ketebalan fase diam, kadar air fase gerak dan fase diam, derajat kejenuhan bejana kromatografi oleh pelarut pengembang (fase gerak) dan ukuran sampel. Kontrol secara sempurna dari variabel-varaibel diatas biasanya tidak dilakukan (Skoog, 1998).

Harga Rf berkisar antara 0 - 0,999, jarak diukur dari pusat noda tiap kromatogram (Touchstone & Dobbins, 1983). Pada KLT-Densitometri untuk mendapatkan noda dengan hasil lebih konstan, maka rentang harga Rf sebaiknya 0,2 sampai 0,8 (Fried & Sherma, 1994). Parameter pemisahan lainnya adalah faktor selektivitas (α) dan resolusi analit (Rs).

2.5.1.1 Faktor selektivitas (α)

Menggambarkan posisi relatif dua puncak yang berdekatan, yaitu perbandingan waktu retensi (tR) komponen A dan waktu retensi (tR) komponen B dengan rumus (Skoog, 1998):

$$\alpha = \frac{tRB}{tRA}$$

dimana: α = faktor selektivitas

tRA = waktu tambat komponen A

tRB = waktu tambat komponen B

untuk pemisahan yang baik ditunjukkan dengan harga $\alpha > 1$ artinya kedua puncak komponen dapat terpisah, sedangkan jika $\alpha = 1$, artinya komponen A tidak terpisah (Skoog, 1998).

2.5.1.2 Resolusi (Rs)/ derajat keterpisahan

Resolusi/derajat keterpisahan merupakan pemisahan kedua puncak komponen dengan sempurna hingga garis dasarnya. Resolusi/derajat keterpisahan analit dengan analit yang lainnya sebaiknya adalah > 1,5 (Skoog, 1998).

$$Rs = \frac{2\,(tR2 - tR1)}{W1 + W2}$$

keterangan : tRB = jarak yang ditempuh oleh analit B

tRA = jarak yang ditempuh oleh analit A

W1 = lebar noda analit A

W2 = lebar noda analit B

Rs = resolusi

2.5.2 Teknik Penampakan Noda

Kromatogram pada KLT merupakan noda-noda yang terpisah setelah visualisasi dengan cara fisika atau kimia. Visualisasi cara fisika yaitu dengan melihat noda kromatogram yang mengabsorbsi radiasi ultraviolet 254 nm atau 365 nm. Pada adsorban yang berfluoresensi dengan radiasi ultraviolet karena telah dicampur dengan zat kimia yang berfluoresensi maka noda akan tampak sebagai pemadaman fluoresensi (*quenching fluoresensi*)(Skoog, 1985). Visualisasi dengan cara kimia adalah dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna yang memberikan warna atau fluoresensi yang spesifik (Skoog, 1985).

Untuk pengamatan noda hasil pemisahan pada kromatogram, dapat dilakukan cara seperti menggunakan sinar lembayung ultra untuk bahan-bahan yang dapat berfluoresensi serta dapat juga dilakukan dengan menyemprotkan suatu larutan pereaksi. EGCG pada teh hijau ini dilihat dari strukturnya bersifat polar dimana memiliki gugus auksokrom yaitu gugus OH (hidroksil) yang terikat pada cincin aromatis dan gugus kromofor yaitu ikatan rangkap terkonyugasi yang akan menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang

270 nm, maka dapat dideteksi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Wu *et al.*, 2000).

2.6 Tinjauan Tentang Densitometri

Penggunaan Densitometri untuk tujuan kuantitatif atas dasar pengukuran kerapatan optik dan noda kromatogram. Kerapatan optik tersebut dinyatakan dalam bentuk luas noda kromatogram. Perhitungan kadar suatu zat dilakukan dengan cara membandingkan luas area sampel dengan luas area zat baku/standar (Touchstone, 1973).

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

Densitometer dioperasikan dengan sistem optis transmisi dan reflektan. Komponen-komponen yang berwarna yang tidak menyerap sinar ultraviolet dapat dianalisis dengan penentuan absorbsi pada panjang gelombang sinar tampak (*visible*) menggunakan sistem optis reflektan dan transmisi. Komponen-komponen tidak berwarna yang menyerap sinar ultraviolet dapat dianalisis dengan mengukur absorbansi sinar ultraviolet yang terjadi menggunakan sistem reflektan (Touchstone & Dobbins, 1983).

Pada prinsipnya analisis kuantitatif secara densitometri hampir sama dengan spektrofotometri. Hanya pada densitometri hubungan antara serapan dan konsentrasi bukan merupakan garis linier akan tetapi garis lengkung mendekati parabola. Hal ini disebabkan oleh adanya penghamburan dari absorben pada lempeng KLT (Mulya & Suharman, 1995).

Hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi tidak dapat dijelaskan dengan hukum Lambert-Beer seperti pada spektrofotometri (Laszlo, 1987). Hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi dapat ditentukan dengan hukum

SURABAYA

Kubelka-Munk, dimana tidak lagi merupakan garis lengkung, tetapi merupakan garis linier, yang dapat dinyatakan dengan rumus (Munson, 1991):

$$-\frac{dI}{dx} = +(S+K)I + S.J$$

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

Keterangan :

I = intensitas REM yang arahnya tegak lurus menuju permukaan lapis tipis pelat KLT

J = intensitas REM yang arahnya tegak lurus meninggalkan permukaan lapis tipis pelat 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 pelat KLT

Untuk harga x = 0 maka perbandingan intensitas cahaya yang dipantulkan (Ir) dengan intensitas cahaya yang datang (Io) 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 :

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

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

Keterangan :

X = tebal lapisan tipis

T = transmitan

R = reflektans

2.6.1 Analisis Kualitatif dengan KLT-Densitometri

Analisis kualitatif dengan KLT dapat dilakukan dengan cara membandingkan pusat noda kromatogram sampel dengan jarak noda kromatogram baku/standar (faktor retardasi = Rf), setelah itu dapat ditentukan panjang gelombang terpilih dengan densitometer (Skoog, 1998).

2.6.2 Analisis Kuantitatif dengan KLT-Densitometri

Analisis kuantitatif dengan KLT-Densitometri dapat dilakukan dengan cara penentuan faktor selektivitas (α) dan derajat keterpisahan/resolusi (Rs).

Penentuan langsung dari noda kromatogram dapat dilakukan (dengan cara "in situ") yaitu dengan cara membandingkan area noda sampel dengan area noda senyawa standar pada pelat KLT dengan menggunakan metode spektroskopi yang sering disebut densitometri (Skoog, 1985).

2.7 Tinjauan Tentang Validasi Metode

Validasi metode merupakan proses metode analisis yang sangat penting yang bertujuan untuk memastikan bahwa metode analisis yang akan dioptimasi memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan (Anonim, 2000).

Menurut USP XXIV NF 19 (2000), parameter-parameter validasi tersebut antara lain selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK). Pada penelitian ini, penentuan kadar EGCG ini termasuk dalam kategori dua, dimana EGCG merupakan suatu senyawa yang mayor dalam katekin teh hijau, sehingga untuk menentukan uji validasi metode perlu dilakukan parameter-parameter validasinya yaitu selektivitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK).

2.7.1 Selektivitas

Langkah pertama yang harus dilakukan untuk analisis kuantitatif yaitu Faktor selektivitas (α) yaitu menggambarkan posisi relatif dua puncak yang berdekatan, yaitu perbandingan waktu retensi (tR) komponen A dan waktu retensi (tR) komponen B, dimana untuk pemisahan yang baik ditunjukkan dengan harga $\alpha > 1$ artinya kedua puncak komponen dapat terpisah, sedangkan jika $\alpha = 1$, artinya komponen A tidak terpisah. (Skoog, 1998).

Kemudian faktor yang lainnya yaitu memastikan bahwa puncak/noda kromatogram analit tidak terganggu dengan zat pengotor tertentu, Jika puncak analit terkontaminasi dengan zat lain maka hasil analisis yang diperoleh akan menyimpang dari keadaan sebenarnya. Resolusi analit dengan analit lainnya sebaiknya lebih 1,5 (Skoog, 1998).

2.7.2 Linieritas

Linearitas suatu metode diuji untuk membuktikan adanya hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon detektor. Penentuan linearitas menurut USP XXIV (2000) menggunakan minimal 5 macam konsentrasi dimana kelima macam konsentrasi tersebut berkisar antara 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan. Untuk menyatakan adanya hubungan korelasi atau tidak, dapat digunakan koefisien korelasi (r), pada analisis regresi y= bX+a dan koefisien variasi fungsi (Vxo).

2.7.3 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

BD merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat dideteksi. BK merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang dapat dikuantitasi ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi eksperimental.

Untuk menghitung batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) dapat digunakan rumus (Carr & Wahlich, 1990).

$$C = K (Sb / Sl)$$

Dimana :

C = konsentrasi pada BD dan BK

K = konstanta, untuk BD =3 dan BK =10

Sl= sensitifitas slop

Sb= standar deviasi *analytical blank signal*

2.7.4 Akurasi dan Presisi Metode

Akurasi metode analisis adalah keterdekatan hasil uji yang didapat dengan metode tertentu dengan kadar sebenarnya. Akurasi sering digambarkan sebagai persen rekoveri (% perolehan kembali). Persyaratan ketepatan yang baik untuk sampel biologis adalah antara 80-120% (Carr & Wahlich, 1990).

Harga persen perolehan kembali dapat dihitung dengan rumus:

$$R = \frac{Csp}{Ks} \text{ X } 100\%$$

$$Csp = \frac{Asp}{Ast} \text{ X } Cst$$

Keterangan : R = % perolehan kembali
Csp = kadar yang didapatkan kembali
Ks = kadar sesungguhnya
Asp = area sampel
Ast = area standar
Cst = konsentrasi standar

Presisi merupakan metode analisis adalah derajat kebolehan hasil uji secara individual jika prosedur dilakukan berulang kali pada berbagai sampel yang sama. Biasanya digambarkan sebagai standar deviasi atau standar relatif (koefisien variasi). Harga koefisien variasi sebaiknya tidak lebih dari 10% (Curniff, 1995). Ketelitian dari suatu metode analisis dinyatakan sebagai koefisien variasi dapat digunakan rumus:

$$KV = \frac{SD}{X}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - x)^2}{n-1}}$$

Keterangan : Kv = koefisien variasi
SD = Standar deviasi
$\bar{X}$ = kadar sampel rata-rata
x = kadar sampel

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Uraian Kerangka Konseptual

Teh merupakan salah satu minuman yang banyak diminati masyarakat. Selain sebagai minuman, teh juga mempunyai banyak khasiat bagi kesehatan. Daun teh hijau mengandung senyawa polifenol dalam kadar yang tinggi antara lain adalah derivat *catechin* yaitu *epicatechin* (EC), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate (*ECG) dan *epigallocatechin gallate* (EGCG). Komponen bioaktif yang paling dominan adalah EGCG yang merupakan antioksidan kuat. Selain derivat *catechin*, daun teh juga mengandung kafein, theobromin, theophyllin, thearubigin, tannin, xantin, minyak atsiri dan fluoride (Hartoyo, 2003).

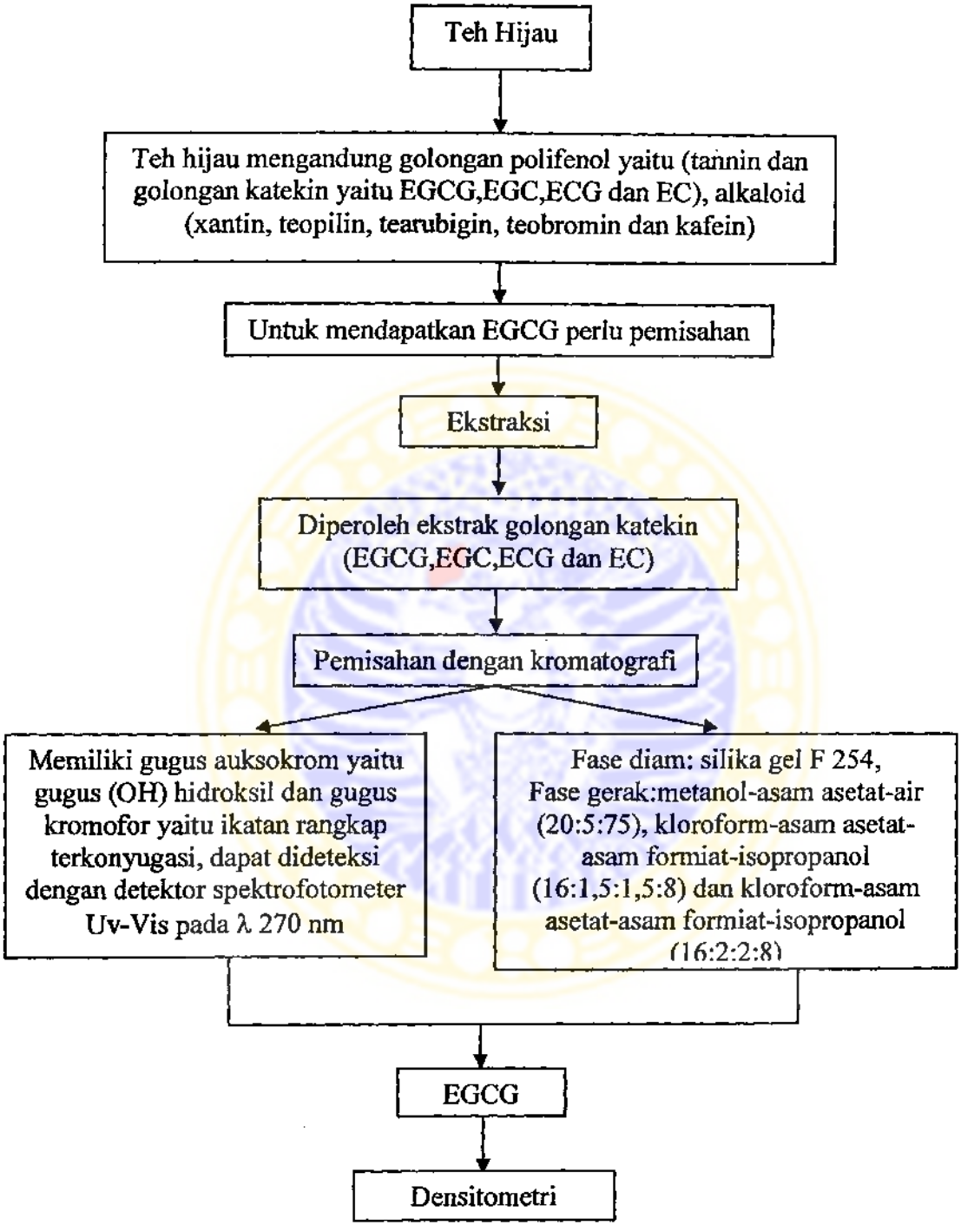
Dalam preparasinya, terlebih dahulu dilarutkan dalam air panas (± 80-90^{0}C), kemudian ditambahkan dengan kloroform, kemudian dikocok pelan, hal ini ditujukan untuk untuk memisahkan dari lemak serta kandungan alkaloidnya (kafein, theobromin, theophyllin, tearubigin, dan xantin) kemudian fase air ditampung dan diekstraksi lagi dengan etil asetat dengan tujuan agar katekin dapat tertarik pada fase ini. Sehingga dari hasil ekstraksi dapat diperoleh ekstrak teh yang mengandung senyawa katekin yaitu EGCG, EGC, ECG dan EC. Kemudian selanjutnya dilakukan pemisahan dengan metode kromatografi. Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan fisik suatu campuran zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing-masing komponen campuran yang terpisah pada fase diam dibawah pengaruh pergerakan fase mobil.

Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF 254, sedangkan untuk fase geraknya adalah metanol-asam asetat-air (20:5:75) (Heftman, 1983), kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8) (Zulkarnain, 1997) dan kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8). Kemudian dari hasil eluasi dari fase gerak-fase gerak tersebut akan dilakukan optimasi untuk di cari fase gerak mana yang sesuai untuk memisahkan EGCG dari kandungan yang lainnya.

EGCG bersifat polar dan EGCG merupakan kandungan terbesar dalam teh hijau yang merupakan antioksidan kuat yang memiliki gugus auksokrom yaitu gugus OH (hidroksil) yang terikat pada cincin aromatis dan memiliki gugus kromofor yaitu ikatan rangkap terkonyugasi (Fessenden & Fessenden, 1986) yang akan menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 270 nm. Maka dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV-Vis (Wu *et al.*, 2000).

Dalam penelitian ini metode yang akan dilakukan untuk analisis EGCG dalam produk teh hijau adalah KLT-Densitometri. Validasi metode untuk analisis EGCG dalam produk teh hijau dengan KLT-Densitometri perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil yang dapat dipercaya dan mendekati kebenaran. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode KLT-Densitometri yang tervalidasi untuk menganalisis kandungan EGCG dalam produk teh hijau. Parameter validasi yang dilakukan meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi.

3.2 Bagan Kerangka Konseptual



BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Bahan

Sampel produk teh hijau

Baku/standar EGCG (Sigma)

Metanol p.a (E.Merck)

Etil asetat (E.Merck)

Asam asetat (E.Merck)

Kloroform p.a (E.Merck)

Asam formiat (E.Merck)

Isopropanol (E.Merck)

Lempeng KLT silika gel F 254 (E.Merck)

Aquades

Kertas saring

4.2 Alat

TLC Densitometer Shimadzu CS 930

Bejana kromatografi

Pipa kapiler

Timbangan analitik Sartorius dengan kepekaan 0,0001 g

Direct reading micro balance L/M Shimadzu

Alat-alat gelas

4.3 Validasi Metode Analisis

4.3.1 Selektifitas

4.3.1.1 Pembuatan Larutan Baku Induk EGCG

Ditimbang teliti dengan neraca mikro analitik 5,000 mg standar EGCG kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10,0 mL sehingga didapatkan larutan baku EGCG 500 ppm.

4.3.1.2 Penyiapan Fase Diam dan Fase` Gerak

Fase diam yang digunakan adalah silika gel F 254. Fase gerak yang dipakai adalah metanol:asam asetat:air (20:5:75) (Heftmann, 1983); kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8) (Zulkarnain, 1997) dan kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8). Untuk pemeriksaan secara kualitatif dilakukan dengan cara menotolkan 2 macam larutan yaitu :

(1) larutan baku EGCG 150,6 ppm

(2) larutan produk teh hijau yang telah diekstraksi

Kedua larutan diatas ditotolkan sebanyak 10 μL, dieluasi dengan 3 macam fase gerak tersebut. Dari ketiga macam fase gerak tersebut akan dicari fase gerak yang dapat memisahkan EGCG dari komponen-komponen yang lainnya.

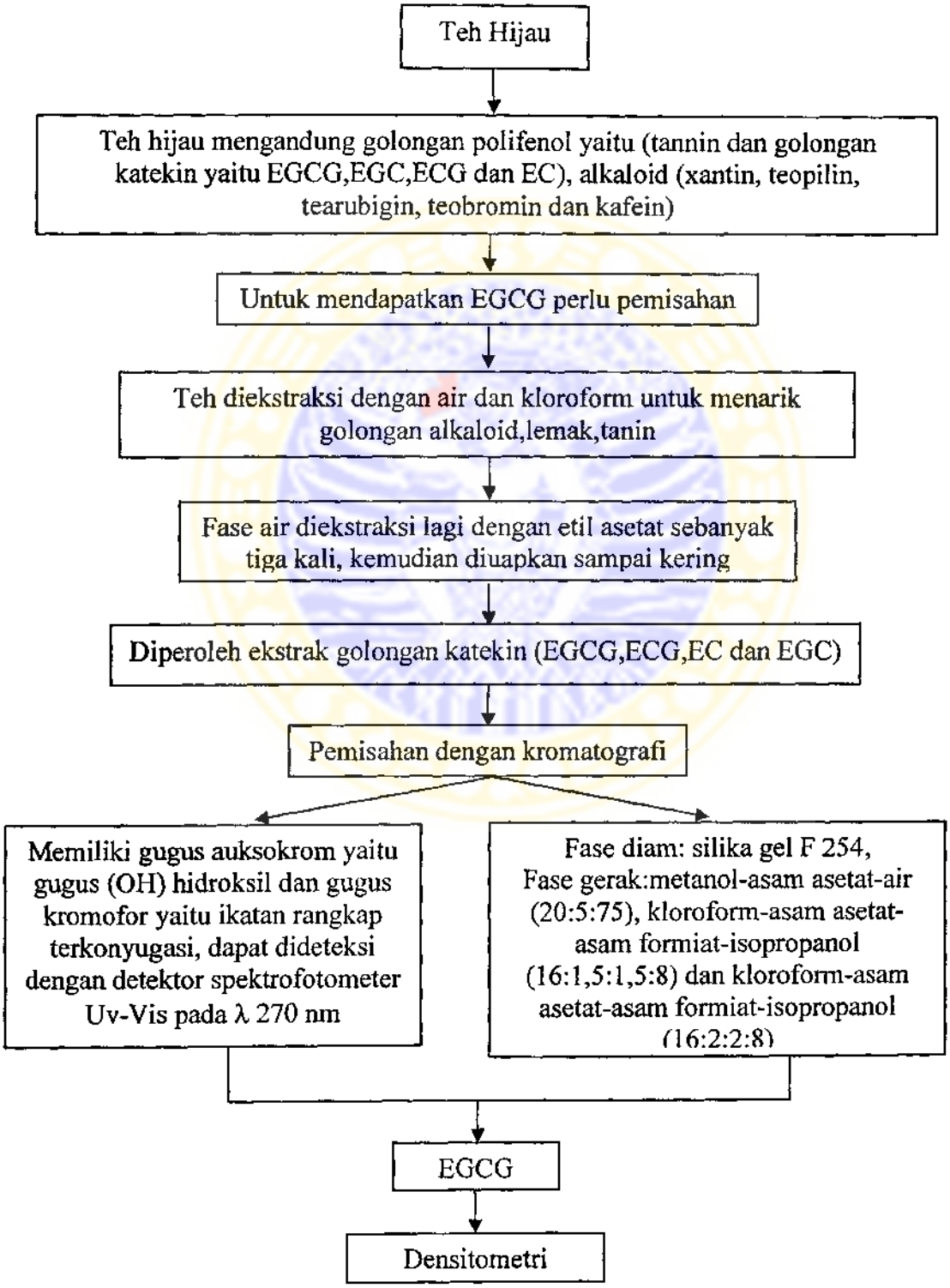
4.3.1.3 Penentuan Panjang Gelombang Terpilih

Larutan baku 150,6 ppm, ditotolkan pada pelat KLT silika gel F 254 sebanyak 10μL, kemudian dieluasi dengan fase gerak terpilih. Noda yang diperoleh diamati spektrum absorban-reflektannya dengan Densitometer. Panjang gelombang terpilih dapat berupa panjang gelombang yang memberikan puncak paling tinggi.

4.3.1.4 Ekstraksi EGCG dalam Produk Teh Hijau

Ditimbang teliti sampel produk teh hijau sebanyak 0,0800 g dengan neraca analitik, dimasukkan dalam 10 ml air panas (± 80-90^{0}C) dalam beker gelas, kemudian didiamkan selama 30 menit, setelah itu disaring dengan kertas saring dan dimasukkan dalam labu ukur 25,0 ml. Kemudian serbuk teh dibilas lagi dengan air panas 10 ml, didinginkan dan dimasukkan dalam labu ukur tersebut dan dibilas lagi dan ditambah air sampai volume ad 25,0 ml. Dari larutan tersebut diambil 10,0 ml dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 5 ml dan dikocok pelan. Hal ini diulang sebanyak 2 kali. Fase kloroform dibuang, kemudian fase air ditampung, kemudian diekstraksi lagi dengan etil asetat masing-masing sebanyak 10,0 ml. Hal ini diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu fase air dibuang, kemudian fase etil asetat ditampung dalam cawan porselen dan diuapkan dalam lemari asam sampai kering.

Hasil yang diperoleh dilarutkan dengan metanol, dimasukkan dalam labu ukur sampai volume ad 10,0 ml. Larutan ditotolkan sebanyak 10 µL, dieluasi dengan fase gerak terpilih, kemudian noda yang diperoleh diamati menggunakan Densitometer (Shirai *et al.*, 1994). Ekstraksi EGCG ini dapat dilihat seperti pada bagan berikut:



4.3.1.5 Penentuan Faktor Retardasi (Rf), Faktor Selektifitas (α) dan Derajat Keterpisahan/Resolusi (Rs)

Larutan sampel yang telah diekstraksi ditotolkan pada pelat KLT silika gel F 254 sebanyak 10 µl, kemudian dihitung nilai Rf, α dan Rs nya. Nilai Rf , α dan Rs dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$Rf = \frac{jarak\ migrasi\ komponen}{jarak\ migrasi\ fase\ gerak}$$

Harga Rf yang baik umumnya berkisar 0,2-0,8 (Fried & Sherma, 1994).

$$\alpha = \frac{tRB}{tRA}$$

Dimana: α = faktor selektifitas
tRA = waktu tambat komponen A
tRB = waktu tambat komponen B

Untuk pemisahan yang baik ditunjukkan dengan harga $\alpha > 1$ artinya kedua komponen dapat terpisah, sedangkan jika $\alpha = 1$, artinya komponen A tidak terpisah.

$$Rs = \frac{2(tRB - tRA)}{W1 + W2}$$

Dimana: tR1 = Jarak yang ditempuh oleh analit A
tR2 = Jarak yang ditempuh oleh analit B
W1 = lebar noda analit A
W2 = lebar noda analit B
Rs = Resolusi

Resolusi/derajat keterpisahan sebaiknya > 1,5 (Fried & Sherma, 1994).

4.3.2 Linieritas

Untuk menentukan linieritas, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dan area EGCG pada berbagai macam konsentrasi. Ditimbang teliti 5,000 mg dengan neraca mikro analitik kemudian dibuat 5 macam konsentrasi 50-150% dari kadar analit yang diperkirakan (Indrayanto & Yuwono, 2002).

Konsentrasi yang akan dibuat yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Konsentrasi tersebut dibuat dengan cara melarutkan 5,000 mg EGCG standar dengan metanol sampai volume ad 10,0 ml dalam labu ukur sehingga didapatkan larutan baku induk 500 ppm. Dari larutan induk 500 ppm dipipet 0,5 ml; 1,0 ml; 2,0 ml masing-masing diencerkan dengan metanol sampai volume ad 5,0 ml sehingga didapatkan konsentrasi 50 ppm; 100 ppm dan 200 ppm. Untuk konsentrasi 250 ppm dibuat dengan memipet 5,0 ml baku induk, diencerkan dengan metanol sampai volume ad 10,0 ml. Dari konsentrasi 250 ppm dipipet 3,0 ml, kemudian diencerkan dengan metanol sampai volume ad 5,0 ml sehingga didapat konsentrasi 150 ppm.

Dari larutan yang didapat, masing-masing ditotolkan pada pelat KLT silika gel F 254 sebanyak 10 µl kemudian dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang telah jenuh oleh uap fase gerak terpilih dan dieluasi. Noda yang dihasilkan diukur areanya dengan Densitometer. Kemudian didapatkan area, setelah itu dibuat kurva jumlah EGCG (µg) terhadap area $_{EGCG}$. Dapat dihitung persamaan regresinya $y = bX + a$, koefisien korelasi (r) dan koefisien variasi fungsi (Vxo).

4.3.3 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Membuat larutan baku dengan 8 macam konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm dan 60 ppm dengan cara memipet 1,0 ml dari baku 100 ppm kemudian diencerkan dengan metanol sampai volume ad 10,0 ml, didapat konsentrasi 10 ppm; memipet 1,0 ml dan 2,0 ml dari baku 150 ppm, masing-masing diencerkan dengan metanol sampai volume ad 5,0 ml didapat konsentrasi 30 ppm dan 60 ppm; dan untuk konsentrasi 20 ppm dan 40 ppm dibuat dengan memipet 1,0 ml sebanyak dua kali dari baku 200 ppm, masing-masing diencerkan dengan metanol sampai volume 5,0 ml dan 10,0 ml Untuk konsentrasi yang 50 ppm dapat dipakai langsung dari konsentrasi pada linieritas. Konsentrasi 2 ppm dan 4 ppm dibuat dengan memipet 1,0 ml dari baku 10 dan 20 ppm masing-masing diencerkan dengan metanol sampai volume 5,0 ml Masing-masing larutan tersebut ditotolkan pada pelat KLT silika gel F 254, dielusi dengan fase gerak terpilih. Untuk menghitung harga Sb, diperoleh dengan menotolkan metanol sebagai blanko, kemudian dieluasi bersama delapan macam

konsentrasi tersebut, selanjutnya analisis dengan Densitometer, kemudian diperoleh area puncak pengotor tertinggi (Np) dan area puncak pengotor terendah (p), sehingga Sb=Np-p/5.

Untuk menghitung BD dan BK dapat dihitung dengan rumus (Indrayanto & Yuwono, 2002) :

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

Dimana: C = konsentrasi pada BD dan BK

Sb = standar deviasi serapan blanko

Sl = sensitivitas slop

K = konstanta, untuk BD = 3 dan BK = 10

4.3.4 Penentuan Akurasi dan Presisi Metode

Penentuan akurasi pada tahap ini dilakukan dengan metode adisi. Ditimbang sampel produk teh hijau sebanyak 0,0800 mg kemudian ditambahkan 1,0 ml standar EGCG 400 ppm (4,115 mg/10,0 ml metanol), dimasukkan dalam 10 ml air panas (± 80^0C) dalam beker gelas, kemudian didiamkan selama 30 menit setelah itu disaring dengan kertas saring dan dimasukkan dalam labu ukur 25,0ml. Kemudian serbuk teh dibilas lagi dengan air panas 10 ml, didinginkan dan dimasukkan dalam labu ukur tersebut dan dibilas lagi dan ditambah air sampai volume ad 25,0 ml. Dari larutan tersebut diambil 10,0 ml dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 5 ml dan dikocok pelan. Hal ini diulang sebanyak 2 kali. Fase kloroform dibuang, kemudian fase air ditampung, kemudian diekstraksi lagi dengan etil asetat sebanyak 10,0 ml. Hal ini diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu fase air dibuang, kemudian fase etil asetat ditampung dalam cawan porselen dan diuapkan dalam lemari asam sampai kering. Hasil yang diperoleh dilarutkan dengan metanol, dimasukkan dalam labu ukur sampai volume 10,0 ml. Proses ekstraksi ini direplikasi sebanyak 5 kali. Untuk perlakuan sampel saja, tanpa adanya penambahan standar EGCG, diekstraksi dengan cara yang sama seperti diatas. Direplikasi sebanyak 5 kali juga. Masing-masing larutan ditotolkan sebanyak 10 µL dan menotolkan juga 5 macam konsentrasi linieritas untuk persamaan regresinya. Dari masing-masing larutan

dieluasi dengan fase gerak terpilih, kemudian dilakukan analisis menggunakan Densitometer. Area yang diperoleh dimasukkan kedalam persamaan regresi linier dalam 1 plate tersebut. Diperoleh kadar, kemudian dihitung % perolehan kembali (% rekoveri).

$$\%\text{rekoveri} = \frac{banyaknya\ EGCG\ total - banyaknya\ EGCG\ sampel}{banyaknya\ EGCG\ yangditambahkan} \text{X } 100\%$$

Untuk presisi metode analisis dihitung berdasarkan harga koefisien variasi dengan rumus :

$$\text{KV} = \frac{SD}{x} \text{ X } 100\%$$

Dimana: KV = koefisien variasi
SD = standar deviasi
X = rata-rata

4.3.5 Penetapan Kadar EGCG dalam Produk Teh Hijau

Ditimbang teliti sampel produk teh hijau sebanyak 0,0800 g dengan neraca analitik, dimasukkan dalam 10 ml air panas (± 80-90^{0}C) dalam beker gelas, kemudian didiamkan selama 30 menit, setelah itu disaring dengan kertas saring dan dimasukkan dalam labu ukur 25,0 ml. Kemudian serbuk teh dibilas lagi dengan air panas 10 ml, didinginkan dan dimasukkan dalam labu ukur tersebut dibilas lagi dan ditambah air sampai volume ad 25,0 ml. Dari larutan tersebut diambil 10,0 ml dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan kloroform sebanyak 5 ml dan dikocok pelan. Hal ini diulang sebanyak 2 kali. Fase kloroform dibuang, kemudian fase air ditampung, kemudian diekstraksi lagi dengan etil asetat sebanyak 10,0 ml. Hal ini diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu fase air dibuang, kemudian fase etil asetat ditampung dalam cawan porselen dan diuapkan dalam lemari asam sampai kering. Hasil yang diperoleh dilarutkan dengan metanol, dimasukkan dalam labu ukur sampai volume 10,0 ml. Hal ini direplikasi sebanyak 5 kali kemudian dilakukan proses ekstraksi yang sama seperti hal diatas. Masing-masing larutan ditotolkan sebanyak 10 µL, ditotolkan juga bersama-sama 5 macam konsentrasi linieritas. Noda yang

diperoleh diamati pada Densitometer untuk melihat area (A) EGCG. Setelah diperoleh area, dihitung kadar analit dengan memasukkan harga (A) ke dalam persamaan garis regresi linier tersebut.

BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1 Validasi Metode Analisis

5.1.1 Selektifitas

5.1.1.1 Pembuatan Larutan Baku Induk

Ditimbang teliti dengan neraca mikro analitik 5,000 mg standar EGCG kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10,0 mL sehingga didapatkan larutan baku EGCG 500 ppm.

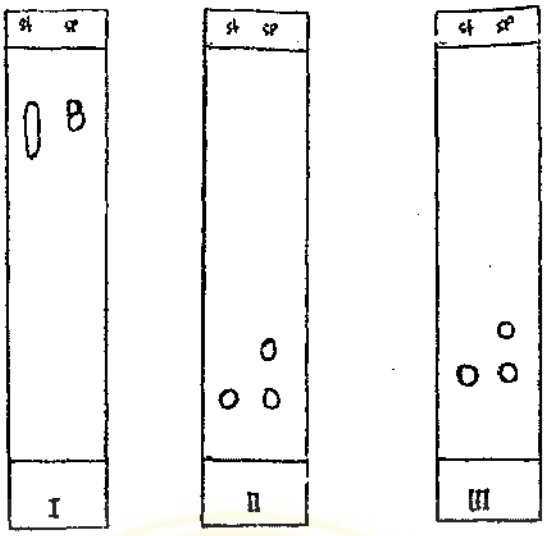
5.1.1.2 Penentuan Fase Gerak Terpilih

Pada penentuan fase gerak dilakukan dengan cara menotolkan larutan standard dan sampel produk teh hijau yang telah diekstraksi pada pelat KLT silika gel F 254, kemudian dieluasi dengan menggunakan beberapa macam fase gerak.

Pada penelitian ini digunakan tiga macam fase gerak yaitu metanol - asam asetat - air (20:5:75); kloroform – asam asetat - asam formiat - isopropanol (16:1,5:1,5:8) dan kloroform - asam asetat - asam formiat - isopropanol (16:2:2:8). Hasil pengamatan pemilihan fase gerak dapat dilihat pada **tabel V.1** dan gambar 5.1.

Tabel V.1 Hasil pengamatan harga Rf, Rs dan α beberapa fase gerak

Komposisi fase gerak	Harga Rf	Rs	α
(I) Metanol-asam asetat-air (20:5:75)	(noda tidak bulat)/ tailing	-	-
(II) Kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8)	Noda standar EGCG Rf= 0,16; sampel ada 2 noda, noda 1 Rf = 0,16 dan noda ke 2 Rf = 0,28	-	-
(III) Kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8)	Noda standar EGCG Rf=0,21; sampel ada 2 noda, noda 1 Rf= 0,21dan noda ke 2 Rf =0,32	2	1,35



Gambar 5.1 Hasil eluasi beberapa macam fase gerak

Keterangan :

I : Fase gerak metanol-asam asetat-air (20:5:75)

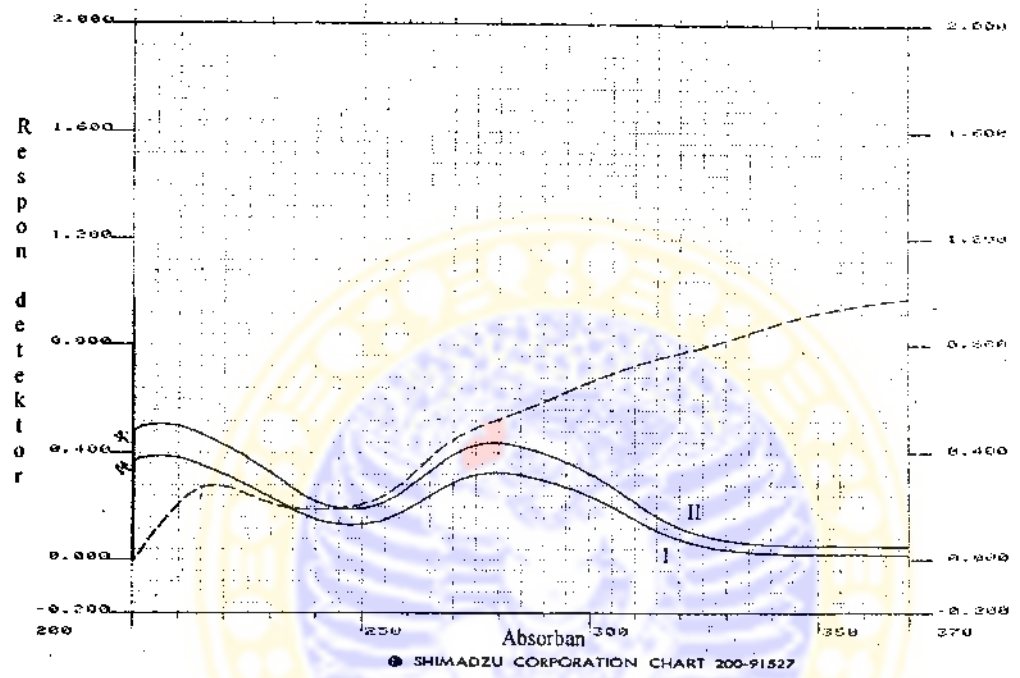
II : Fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8)

III : Fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8)

Dari gambar terlihat bahwa fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) memberikan hasil yang lebih baik dari pada 2 fase gerak lainnya yaitu diperoleh harga Rf = 0,21; Rs = 2 dan α = 1,35, dimana persyaratan untuk Rf = 0,2-0,8; Rs > 1,5 dan α > 1. Oleh karena itu pada pengerjaan selanjutnya digunakan fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) (Perhitungan Rs dan α dapat dilihat pada lampiran 1).

5.1.1.3 Penentuan Panjang Gelombang Terpilih

Hasil pengamatan penentuan panjang gelombang (λ) maksimum EGCG pada standar dan sampel teh hijau pada rentang panjang gelombang (λ) 200-370 nm adalah sebagai berikut:



Gambar 5.2. Spektrum Absorban-Reflektan standar EGCG dan sampel teh hijau yang telah diekstraksi dengan pengukuran menggunakan Densitometer CS 930. (Dengan keterangan gambar I : Standar EGCG kadar 150,6 ppm; II : sampel produk teh hijau yang telah diekstraksi).

Standar dan sampel memberikan puncak absorban-reflektan yang sama yaitu pada panjang gelombang 278 nm, maka panjang gelombang maksimum yang terpilih adalah 278 nm.

5.2 Linieritas

Dari larutan baku induk EGCG 500 ppm (5,043mg/10,0 ml), dibuat lima macam konsentrasi yaitu 50 ppm; 100 ppm; 150 ppm; 200 ppm dan 250 ppm masing-masing larutan ditotolkan pada pelat KLT silika gel F 254 sebanyak 10 µL, dieluasi dengan fase gerak terpilih. Noda yang diperoleh diamati pada Densitometri. Penentuan linieritas dilakukan dengan menghitung perbandingan area EGCG terhadap lima macam konsentrasi EGCG yang diukur pada panjang gelombang 278 nm, hasil penentuan ini dapat dilihat pada **tabel V.2** dan gambar 5.3.

Tabel V.2 Hasil pengamatan linieritas EGCG

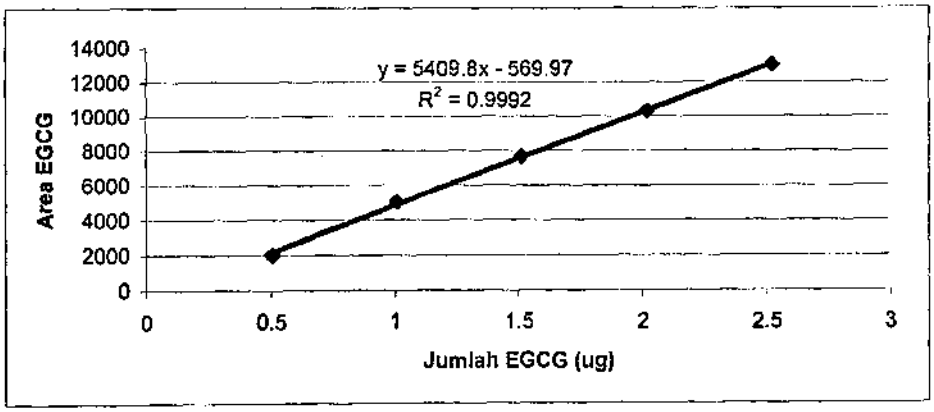
Konsentrasi EGCG (ppm)	Jumlah EGCG (µg)	Area
50,43	0,5043	2008,344
100,86	1,0086	5056,73
151,29	1,5129	7668,27
201,72	2,0172	10323,26
252,15	2,5215	13015,84

Persamaan garis regresi Y = 5409,8 X-569,97

r_{hitung} = 0,9996; r_{tabel} (α=0,05 ; n=3) = 0,878

Koefisien variasi fungsi (Vxo) = 3,94%

Harga $r_{hitung} > r_{tabel}$, Vxo < 5% sehingga ada hubungan yang linier antara konsentrasi EGCG terhadap area EGCG (contoh perhitungan Vxo dapat dilihat pada lampiran 2).



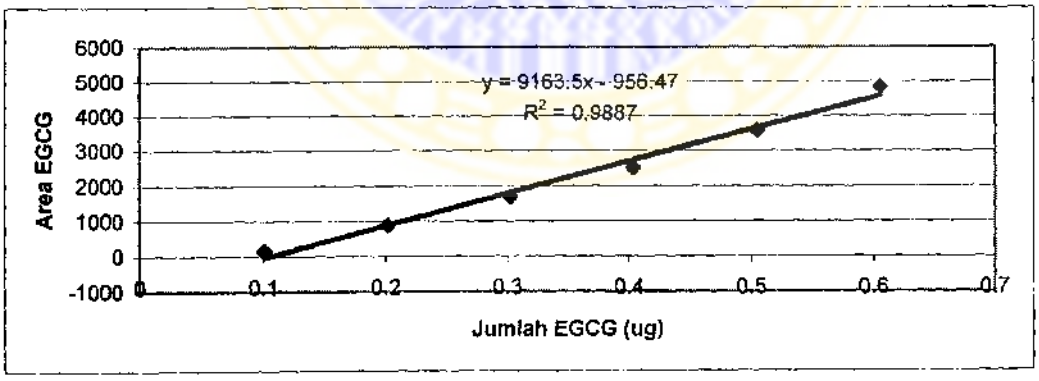
Gambar 5.3 Kurva Hubungan antara banyaknya EGCG (µg) terhadap Area EGCG untuk Linieritas.

5.2 Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Menotolkan delapan macam konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm dan 60 ppm sebanyak 10 µL pada pelat KLT silika gel F 254, dieluasi dengan fase gerak terpilih. Untuk menghitung harga Sb, diperoleh dengan menotolkan metanol sebagai blanko, dieluasi bersama delapan macam konsentrasi tersebut, Noda yang diperoleh diamati dengan Densitometer. kemudian diperoleh area puncak pengotor tertinggi (Np) dan area puncak pengotor terendah (p), sehingga Sb=Np-p/5. Hasil penentuan ini dapat dilihat pada **tabel V.3** dan **V.4**

Tabel V.3. Hasil penentuan BD dan BK untuk EGCG

Konsentrasi EGCG (ppm)	Jumlah EGCG (µg)	Area
10,086	0,10086	151,191
20,172	0,20172	888,230
30,258	0,30258	1693,504
40,344	0,40344	2516,215
50,43	0,5043	3578,961
60,516	0,60516	4841,79



Gambar 5.4 Kurva Hubungan antara banyaknya EGCG (µg) terhadap area EGCG untuk Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.

$Y = 9163,3X - 956.41$; $r_{hitung} = 0,9943$; $r_{tabel}\ (\alpha=0,05) = 0,878$

Tabel V.4. Pengamatan serapan blanko

Jumlah (µg)	Area
-	349,718
-	228,554
-	109,257
-	222,910
-	94,195
-	62,023
-	77,968

Sb = Np-p/5 = 349,718-62,023/5 = 57,539

BD = (3XSb)/Sl = 3X57,539/9163,3 = 0,0188 µg

BK = (10XSb)/Sl = 10X57,539/9163,3 = 0,0627 µg

Harga $r_{hitung} > r_{tabel}$, sehingga ada hubungan yang linier antara konsentrasi EGCG dengan area EGCG. Didapat harga BD EGCG = 0,0188 µg dan harga BK EGCG =0,0627 µg. (perhitungan BD dan BK dapat dilihat pada lampiran 3).

5.4 Penentuan Presisi

Standar 150,6 ppm ditotolkan sebanyak 10 kali berturut-turut pada pelat KLT silika gel F 254, dieluasi dengan fase gerak terpilih, kemudian analisis selanjutnya dengan Densitometer dan diperoleh rata-rata area. Dari data area yang didapat dihitung koefisien variasinya (KV). Hasil penentuan presisi dapat dilihat pada **tabel V.5.**

Tabel V.5. Hasil Penentuan Presisi Standar EGCG

Kadar (ppm)	Jumlah (µg)	Area
150,6	1,506	11538.07
150,6	1,506	11761,16
150,6	1,506	12217,41
150,6	1,506	12491,33
150,6	1,506	12685,11
150,6	1,506	12376,25
150,6	1,506	11844,37
150,6	1,506	10846,11
150,6	1,506	11446,11
150,6	1,506	12221,86

Rata-rata = 11942,798

SD = 533,7183

KV = 4,47 %

Uji presisi untuk standar EGCG dengan Densitometer menunjukkan harga KV 4,47%, memenuhi persyaratan validasi yaitu KV untuk sampel biologis adalah kurang dari 10 % sehingga harga KV EGCG memenuhi persyaratan (Curniff, 1995).

5.5 Penentuan Akurasi dan Presisi Metode

Hasil penentuan akurasi metode standar adisi yaitu dengan menambahkan standar EGCG 400 ppm (4,115 mg/10,0 mL metanol) sebanyak 1,0 ml bersama sampel teh yang telah ditimbang, kemudian diekstraksi bersama-sama seperti pada butir 4.3.4. Ekstraksi ini direplikasi sebanyak 5 kali. Untuk sampel saja tanpa adanya penambahan EGCG standar juga diekstraksi kemudian direplikasi sebanyak 5 kali juga. Masing-masing larutan ditotolkan sebanyak 10 µL bersamaan juga ditotolkan 5 macam konsentrasi linieritas sebagai kurva baku. Noda yang diperoleh diukur pada Densitometer. Area yang didapat dimasukkan pada persamaan regresi linier didapat kadar, setelah itu dapat dihitung prosen rekoveri dan koefisien variasi (KV).

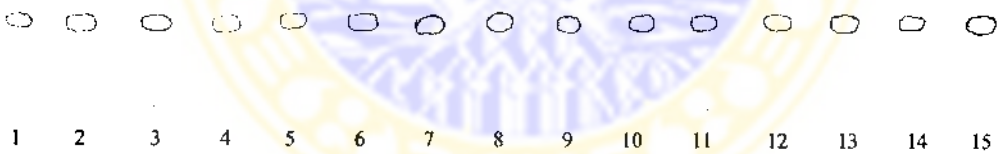
Harga prosen perolehan kembali, KV dan gambar hasil eluasi untuk akurasi dan presisi metode dapat dilihat pada **tabel V.6, tabel V.7** dan gambar 5.5.

Tabel V.6 Hasil Penentuan Linieritas untuk Akurasi

Konsentrasi (ppm)	Jumlah EGCG (μg)	Area
50,43	0,5043	1637,617
100,86	1,0086	5875,27
151,29	1,5129	9023,55
201,72	2,0172	13305,44
252,15	2,5215	15707,06

Persamaan garis regresi $Y = 7053,2\ X - 1560,9$

$r_{hitung} = 0,9964$; $r_{tabel}\ (\alpha=0,05) = 0,878$



Gambar 5.5. Hasil eluasi penentuan Linieritas untuk Akurasi dan presisi Metode EGCG

Keterangan gambar :

1-5 : larutan standar EGCG dengan konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm.

6-10 : larutan sampel produk teh hijau yang telah diekstraksi dengan replikasi sebanyak 5 kali.

11-15 : larutan sampel produk teh hijau dengan penambahan standar EGCG sebanyak 1,0 ml 400 ppm yang diekstraksi bersama-sama (replikasi 5 kali).

Tabel V.7 Hasil Penentuan Akurasi dan Presisi Metode dalam sampel produk Teh Hijau.

Replikasi	Area Sp+std	Banyaknya EGCG total (Sp+Std EGCG) (µg/10µl)	Banyaknya EGCG dalam Sampel (µg/10µl)	Std (EGCG) yang ditambahkan (µg/10µl)	% perolehan kembali
1	6282,46	1,11203	0,95120	0,1646	97,71
2	6384,22	1,12646	0,96887	0,1646	95,74
3	6206,16	1,10121	0,98568	0,1646	70,19*
4	6346,11	1,12106	0,98752	0,1646	81,14
5	6662,30	1,16589	1,01605	0,1646	91,03
					x = 91,41% SD= 6,404 KV=7,01%

Keterangan (*); data ditolak karena diluar rentang x ± 2,5 SD (Day & Underwood, 1991).

Pada penentuan akurasi didapatkan rata-rata prosen perolehan kembali 91,41% dimana syarat penentuan akurasi untuk sampel biologis sebesar 80-120% (Carr & Wahlich, 1990). Contoh penentuan prosen perolehan kembali dicantumkan pada lampiran 4.

Pada penentuan presisi metode didapatkan harga KV= 7,01%, dimana persyaratan presisi metode untuk sampel biologis (KV) < 10%, sehingga presisi metode masih dalam rentang yang dipersyaratkan.

5.6 Penetapan Jumlah EGCG dalam Produk Teh Hijau

Pada penetapan kadar dilakukan preparasi sampel produk teh hijau seperti pada butir 4.3.5, ditotolkan sebanyak 10 µl dan dieluasi dengan fase gerak terpilih. Area yang diperoleh dimasukkan ke persamaan regresi linier, kemudian dihitung kadar untuk mengetahui banyaknya EGCG yang terdapat pada sampel teh hijau. Penentuan penetapan kadar EGCG dapat dilihat pada tabel V.8.

Tabel V.8 Penetapan jumlah EGCG dalam produk teh hijau.

Penimbangan Sampel (mg)	Area sampel	Kadar EGCG (µg)	Kadar EGCG %
80,63	5148,05	0,95120	3,21
80,21	5279,84	0,96887	3,29
80,37	5391,28	0,98568	3,34
80,41	5404,24	0,98752	3,36
80,54	5605,44	1,01605	3,45
			$\bar{x}$ = 3,33% SD = 0,08

Kadar EGCG rata-rata dalam sampel produk teh hijau = 3,33 ± 0,08%. Contoh perhitungan penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau dapat dilihat pada lampiran 5.

BAB VI
PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif untuk menetapkan kadar EGCG dalam produk teh hijau dengan metode KLT-Densitometri. Sampel produk teh hijau dilakukan ekstraksi terlebih dahulu agar lebih mudah dalam analisis selanjutnya. Dalam proses ekstraksi meliputi berbagai tahap. Tahap pertama adalah menggunkan air panas untuk melarutkan semua pengotor yang larut dalam air panas. Tahap kedua fase air kembali diekstraksi dengan kloroform untuk menarik alkaloid, lemak dan klorofil. Tahap ketiga adalah ekstraksi menggunakan etil asetat untuk menarik senyawa katekin dimana termasuk EGCG didalamnya.

Pada validasi metode analisis akan dilakukan selektifitas, linieritas, batas deteksi (BD), batas kuantitasi (BK), akurasi dan presisi. Pada uji selektifitas fase diam yang digunakan adalah silika gel F 254. Untuk fase gerak, akan dilakukan optimasi terlebih dahulu terhadap 3 macam fase gerak yaitu metanol-asam asetat-air (20:5:75), kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8) dan kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8). Untuk fase gerak metanol-asam asetat-air (20:5:75) noda yang dihasilkan tailing. Untuk fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:1,5:1,5:8) diperoleh harga Rf untuk sampel dan standar 0,16 dan fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) diperoleh harga Rf antara sampel dan standar 0,21, Rs = 2 dan α = 1,35. Harga Rf yang memenuhi persyaratan Rf optimum yaitu 0,2-0,8, Rs > 1,5 dan α > 1 (Fried & Sherma, 1994). Berdasarkan harga persyaratan tersebut maka dipilih fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) untuk analisis selanjutnya. Hasil pengamatan penentuan fase gerak dapat dilihat pada gambar 5.1.

Beradasarkan spektrum yang diperoleh, maka panjang gelombang yang terpilih untuk pengukuran EGCG adalah 278 nm. Dipilih panjang gelombang maksimum dari EGCG karena pada panjang gelombang maksimum, diharapkan kesalahan pengukuran yang diperoleh lebih kecil, sehingga diperoleh

hasil yang lebih teliti. Hasil pengamatan penentuan panjang gelombang maksimum EGCG dapat dilihat pada gambar 5.2.

Pengujian linieritas EGCG dihasilkan suatu kurva linieritas 5 konsentrasi EGCG dengan persamaan garis regresi Y = 5409,8 X – 569,97 dengan harga koefisien korelasi (r)= 0,9996 > r tabel (0,878) dan Vxo = 3,94 %, yang mana syarat Vxo adalah < 10% dapat dinyatakan bahwa ada korelasi yang linier antara banyaknya EGCG dengan area yang didapat. Oleh karena itu persamaan linieritas tersebut dapat digunakan untuk penetapan kadar EGCG dalam sampel produk teh hijau. Hasil pengamatan linieritas EGCG dapat dilihat pada tabel V.2.

Penentuan harga batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) yang dibuat dengan 5 macam konsentrasi, didapat persamaan regresi Y= 9163,3X – 956,41 ; r=0,9943; (α=0,05; n = 3) yaitu 0,878. Diperoleh harga BD = 0,0188 µg dan BK =0,0627 µg. Hal ini berarti kadar EGCG dalam produk teh hijau dapat dideteksi dan dikuantitasi apabila konsentrasinya sama dengan atau lebih besar dari harga batas deteksi yaitu 0,0188 µg dan dapat ditentukan kadarnya apabila konsentrasi EGCG lebih besar dari harga batas kuantitasi yaitu 0,0627 µg.

Penentuan akurasi EGCG dengan metode adisi, EGCG standar ditambah dalam larutan daun teh, kemudian diekstraksi bersama-sama. Hal ini direplikasi sebanyak 5 kali. Diperoleh persen rekoveri 91,41% dimana persyaratan akurasi untuk sampel biologis mempunyai rentang % rekoveri antara 80-120% (Carr & Wahlich, 1990) sehingga % rekoveri memenuhi persyaratan.

Penetuan presisi untuk standar EGCG, dilakukan dengan menotolkan standar EGCG dengan jumlah dan volume yang sama dan direplikasi sebanyak sepuluh kali, didapatkan harga KV 4,47%. Harga KV ini masih memenuhi persyaratan validasi, karena untuk sampel biologis persyaratan presisi adalah kurang dari 10% sehingga dapat digunakan untuk analisis selanjutnya (Cumiff, 1995).

Pada penentuan presisi metode untuk EGCG, harga koefisien variasi (KV) yang diperoleh sebesar 7,01%. Sedangkan persyaratan presisi metode untuk sampel biologis adalah < 10%, sehingga dapat disimpulkan bahwa presisi metode memenuhi persyaratan.

Setelah semua parameter validasi terpenuhi pada penelitian ini, maka dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah telah memenuhi persyaratan validasi, sehingga dapat dilakukan penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau yang beredar dipasaran. Pada penetapan kadar EGCG dalam sampel produk teh hijau didapatkan kadarnya (3,33 ± 0,08) %.

BAB VII
KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Fase gerak terpilih untuk penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau adalah kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) dengan harga Rf = 0,21 ; Rs = 2 dan α = 1,35.
2. Penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau dengan menggunakan metode KLT-Densitometri memenuhi persyaratan validasi metode.
3. Kadar rata-rata EGCG dalam produk teh hijau adalah (3,33 ± 0,08)%.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian, metode KLT-Densitometri dapat digunakan untuk menentukan kadar EGCG pada produk teh hijau dengan menggunakan fase diam silika gel F 254 dan fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8).

DAFTAR PUSTAKA

Amarowicz, R., Shahidi, F., Wiczkowski, W., 2003. Separation of individual catechins from green tea using silica gel column chromatography and HPLC. **Journal of Foods Lipids**, 10:165-167.

Anonim., 2000. **The United States Pharmacopeia**. 24th edition. Rockville: United States Pharmacopeia, Inc., pp. 2149-2152.

Anonim., 1970. **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 14th Edition, Pennsylvania, Mack Publishing Company. Pp. 1578.

Budavari, S., 1996. **The Merck Index An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological,** 12th edition, Merck & Co., Inc., pp 595.

Carr, G.P and Wahlich, J.C., 1990. Appractical Approach to Method Validation in Pharmaceutical and Analysis, **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, 8:613-626.

Day, R.A., and Underwood, A.L., 1991. **Quantitative Analysis** sixth edition, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, p 23-26.

Fried, B. and Sherma, J., 1994. **Thin Layer Chromatography, Techniques and Applications**. 3rd edition, revised and expanded, New York : Marcel Dekker, Inc.

Fessenden, R, J., and Fessenden, J, S., 1986. **Kimia Organik.** Terjemahan (Penerjemah Pudjaatmaka.H.A.), Edisi ketiga, Surabaya:Erlangga, hal 446-448.

Fulder, S., 2004. **Khasiat Teh Hijau.** Terjemahan, Jakarta: PT. Prestasi Pustakaraya.

Hartoyo., 2003. **Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan**. Yogyakarta, Kanisius. hal 9-22

Hamilton, R., and Hamilton, S., 1987. **Thin Layer Chromatography Analytical Chemistry by Open Learning.** Chicester : John Wiley & Sons.

Heftmann, E., 1983. Chromatography fundamentals & applications of chromatographic & electrophoretic methods part B : applications., **Journal of Chromatography library**, 226 : pp 416-421.

Indrayanto, G., and Yuwono, M., 2002. Validation of TLC Analyses In:**Encyclopedia of Chromatography.** New York: Marcel Dekker Inc., pp.1-3.

Kim, J.I., Hong, S.B., Row, K.H., 2002. Effect of Particle size in preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography on the isolation of epigallocatechin gallate from koren green tea. **Journal of Chromatography A,** 949(1-2):275:80

Kantasubrata, J., 1991. Perkembangan Bahan untuk Keperluan TLC, **Warta Kimia Analitik.** No.9. Hal 4-7.

Laszlo, R.T., 1987. **Quantitative Thin Layer Chromatography and Its Industrial Aplications**: Marcel Dekker, Inc. pp 17-23

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

Muljana, W., 1993. **Petunjuk praktis Bercocok Tanam Teh**. Semarang, Aneka Ilmu.

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

Munson, J. W, 1991. **Analisis Farmasi Metode Modern, Parwa, B.**, vol.II, Airlangga University Press. Hal. 125-134

Patricia Curniff, 1995, **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 16th ed, AOAC International, Virginia USA.

Pescok, R. L., Shields, D. L., Cairns, T., and William, MC, G.I., 1976. **Modern Methods of Chemical Analysis**. 2 nd edition, John Wiley and Sons. Inc. USA, pp. 28-38.

Sakata, I., Ikeuchi, M., Maruyama, I., and Okuda T. Quantitavie analysis of (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves by high-performance liquid chromatography. **Yakugaku Zasshi**, 1991 Dec ; 111(12) : 790-3

Skoog, D. A. 1998, **Principles of Instrumental Analysis**. 5th ed., Harcourt Bruce and Company, USA, pp. 761-765.

Skoog, D. A. 1980. **Principles of Instrumental analysis**. 3rd edition, New York, Secunders College Publishing, pp. 836-897.

Shirai, T., Sato, A., and Hara, Y., 1994. Epigallocatechin gallate: the major Causative agent of green tea-induced asthma, **Chest.** 106 : 1801-05

Touchstone, J. C. and Dobbins, M. F. 1983. **Practice of Thin Layer Chromatography** 2nd ed., John Wiley & Sons., pp. 256.

Wu, J., Xie, W., and Paliszyn, J., 2000. Automated in-tube Solid Phase Microextraction Coupied with HPLC ES–MS for the Determination of Catechins and Caffeine in tea. **The Analyst**, 125:2216-22.

Zulkarnain, B.S., 1997. Standarisasi Ekstrak Etanol dari Teh Hijau dengan Parameter EGCG (*epigallocatechin gallate*). **Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga**, Surabaya.

LAMPIRAN 1

Perhitungan faktor selektivitas (α) dan derajat keterpisahan (Rs) (Fried & Sherma, 1994).

$$Rs = \frac{2(tR2 - tR1)}{W1 + W2}$$

Resolusi EGCG dari senyawa lain yang didekatnya dalam teh hijau dengan menggunakan fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) dengan tR2 = 4,17; tR1 = 3,07; W1 = 0,7 ; W2 = 0,4, sehingga dapat dihitung :

$$Rs = \frac{2(4,17 - 3,07)}{0,7 + 0,4} = \frac{2,2}{1,1} = 2$$

$$\alpha = \frac{tR2}{tR1} = \frac{4,17}{3,07} = 1,35$$

LAMPIRAN 2

Perhitungan Koefisien Variasi Fungsi (Vxo)

Jumlah EGCG µg (xi)	Area (y)	Yi = bxi +a	$(Y-Yi)^2$	X^2
0,5043	2008,344	2158,19214	22454,46506	0,2543
1,0086	5056,73	4523,25828	284593,076	1,01727
1,5129	7668,27	7614,51642	2889,44736	2,28886
2,0172	10323,26	10342,67856	377,08047	4,06909
2,5215	13015,84	13070,8407	3025,077	6,35796
∑= 7,5645 x = 1,5129			∑= 313338,1459	∑= 13,98748

Y = 5409,8 X – 569,97
r = 0,9996

$$Sy = \left[\frac{\Sigma(yi-y)^2}{n-2}\right]^{1/2}$$

$$= \sqrt{\frac{313338,1459}{3}} = 323,18113$$

$$Sxo = \frac{Sy}{b} = \frac{323,18113}{5409,8} = 0,05973$$

$$Vxo = \frac{Sxo}{\bar{x}} = \frac{0,05973}{1,5129} \times 100\ \% = 3,94\ \%$$

LAMPIRAN 3

Perhitungan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Penentuan harga Sb

Jumlah (µg)	Area
-	349,718
-	228,554
-	109,257
-	222,910
-	94,195
-	62,023
-	77,968

Sb = Np-p/5

Np= 349,718

P= 62,023

Sb= 349,719-62,023/5 = 57,539

Penentuan harga Sl

Jumlah (µg)	**Area**
0,1004	151,191
0,208	888,230
0,3012	1693,504
0,4016	2516,215
0,502	3578,961
0,6024	4841,79

Y= 9163,3X – 956.41

Slope (Sl)= 9163,3

Sb= Np-p/5 = 349,718-62,023/5 = 57,539

BD = (3XSb)/Sl = 3X57,539/9163,3 = 0,0188 µg

BK = (10XSb)/Sl = 10X57,539/9163,3 = 0,0627 µg

LAMPIRAN 4

Contoh Perhitungan Persen Rekoveri dan Presisi Metode

- Contoh perhitungan adisi standar EGCG 1,0 ml 411,5 ppm

  1,0 ml standar dalam 25,0 ml larutan teh mengandung 411,5 µg.

  Dalam 10,0 ml = $\frac{10}{25}$ X 411,5 µg = 164,6 µg

  Dalam 10,0 ml metanol = 164,6 µg

  Dalam 10,0 µl = $\frac{10ul}{10000}$ X = 164,6 µg = 0,1646 µg

  Persamaan regresi linier Y = 7053,2 X – 1560,9

- Area sampel = 5148,05 dimasukkan persamaan regresi, sehingga didapat banyaknya EGCG banyaknya EGCG 0,951202 µg.

- Perhitungan untuk sampel+standar replikasi 1:

  Area 6282,46, dimasukkan kepersamaan regresi, maka banyaknya EGCG = 1,112039 µg.

  % rekoveri = $\frac{1,112039 - 0,951202}{0,1646}$ X 100% = 97,71%

- Dengan cara yang sama dapat dihitung % rekoveri untuk replikasi yang kedua sampai replikasi yang kelima. Sehingga rata-rata % rekoveri yang diperoleh adalah 91,41%.
- Untuk presisi metode diperoleh dari data akurasi metode didapat harga koefisien variasinya (KV) = 7,01%

LAMPIRAN 5

Contoh perhitungan Penetapan Kadar EGCG dalam Produk Teh Hijau

Replikasi 1 :

- Penimbangan sampel 80,63 mg, dilarutkan dalam 25,0 ml air panas, setelah proses ekstraksi, dilarutkan metanol ad 10,0 ml → ditotolkan 10 µl
- Diperoleh area sampel 5148,05
- Area dimasukkan kepersamaan regresi yang dalam 1 plate tersebut Y = 7053,2 X – 1560,9 → diperoleh jumlah EGCG = 0,951202 µg = 95,1202 ppm.
- Rata-rata % rekoveri dari akurasi adalah 91,41%, berarti :

Jumlah EGCG dalam sampel, dalam 10 µl = 0,951202 µg = 95,1202 ppm

Dalam 25,0 ml = 25,0/1000 X 95,1202 = 2,378 mg

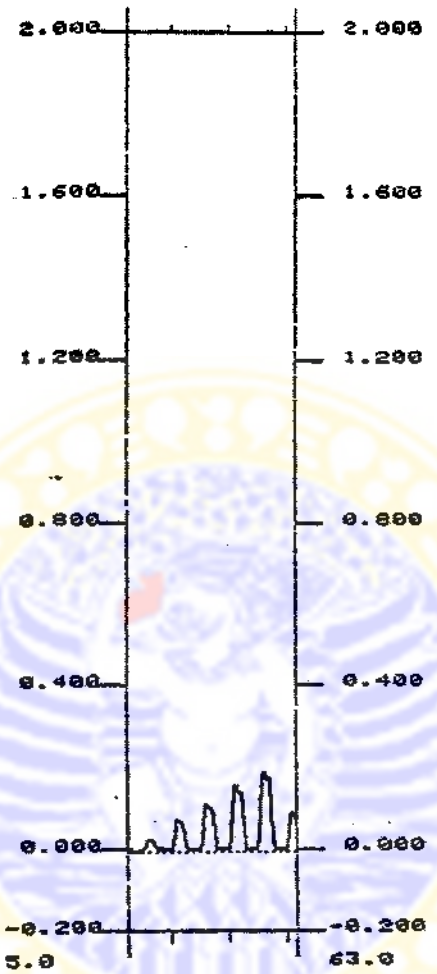
Rata-rata % rekoveri = 91,41 %, maka = $\frac{100}{91,41}$ X 2,378 mg = 2,59 mg

Penimbangan sampel 80,63 mg, maka :

Jumlah EGCG dalam sampel produk teh hijau = $\frac{2,59}{80,63}$ X 100% = 3,21%

LAMPIRAN 6

Gambar Kromatogram linieritas

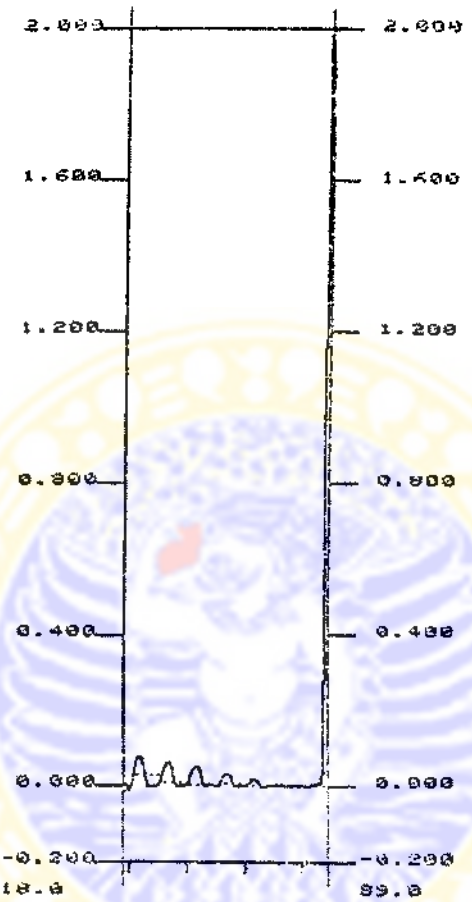


LANE NO. 1

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	11.7	2008.344	V	5.2
2	23.2	5056.73	VV	13.2
3	33.2	7668.27	VV	20.1
4	42.7	10323.26	VV	27.1
5	53.0	13015.84	V	34.1
	TOTAL	38072.47		

LAMPIRAN 7

Gambar Kromatogram Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi

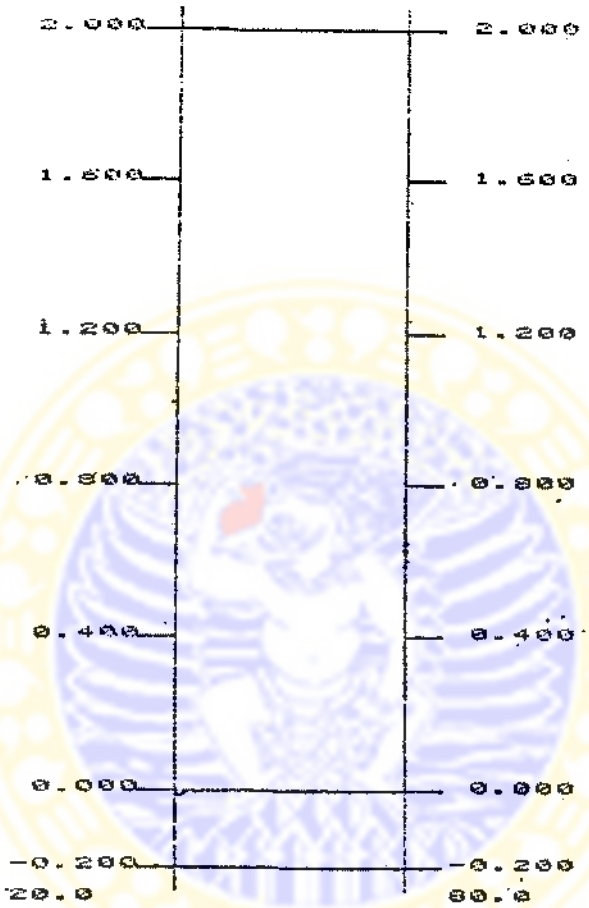


LANE NO. 1

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	24.5	4841.79		35.4
2	33.5	3578.961		26.1
3	42.5	2516.215		18.4
4	54.0	1693.504		12.3
5	62.5	888.230		6.4
6	70.7	151.191		1.1
	TOTAL	13669.90		

LAMPIRAN 8

Gambar serapan Blanko untuk Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

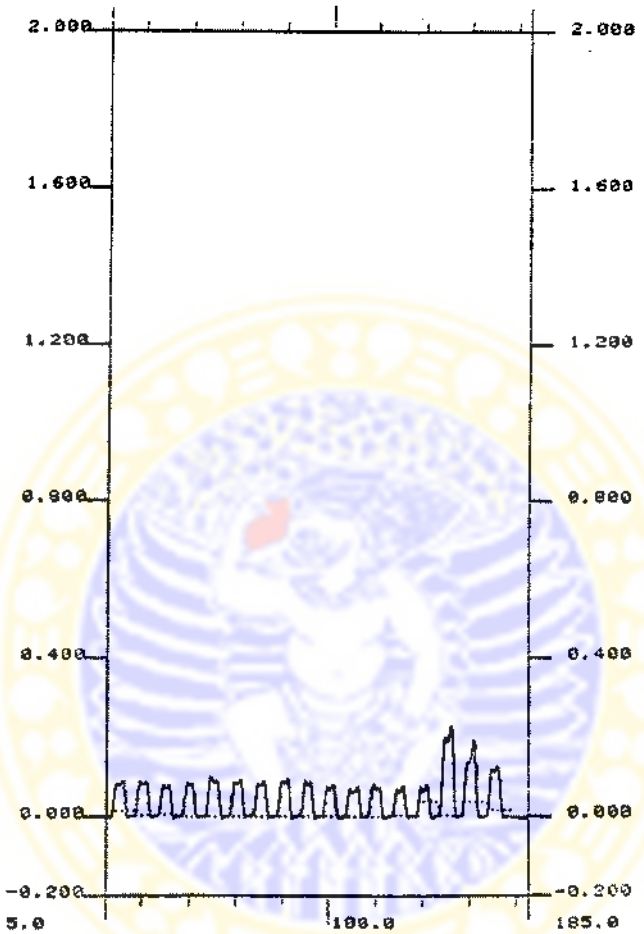


LANE NO. 1

NO.	Y POS.	AREA.	MARK	%
1	23.5	349.718		30.5
2	34.5	228.554	V	19.9
3	47.2	109.257	V	9.5
4	57.5	222.910	V	19.4
5	65.0	94.195	V	8.2
6	70.0	62.923	V	5.4
7	75.0	77.968	V	6.8
	TOTAL	1144.629		

LAMPIRAN 9

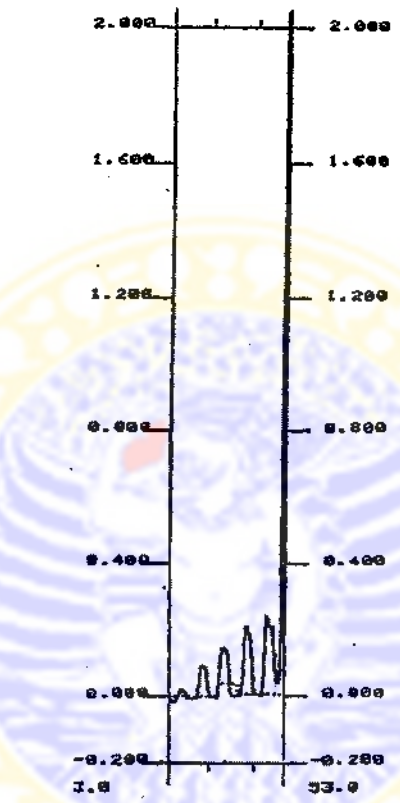
Gambar Kromatogram untuk Akurasi dan Presisi



NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	11.0	6352.41		5.3
2	20.5	6099.19		5.1
3	30.0	5476.51		4.5
4	39.7	5682.44		4.7
5	50.2	6642.30	V	5.5
6	60.5	6346.11	V	5.3
7	70.5	6206.14	V	5.2
8	80.5	6384.22	V	5.3
9	90.2	6282.46	V	5.2
10	100.0	5605.44		4.6
11	110.2	5404.24	V	4.5
12	120.2	5391.28	V	4.5
13	130.7	5279.84		4.4
14	140.7	5148.95		4.3
15	150.5	15494.57		12.9
16	161.0	12429.05		10.4
17	171.0	9092.86		7.6
	TOTAL	119337.3		

LAMPIRAN 10

Gambar Kromatogram Linieritas untuk Akurasi dan Presisi Metode



LANE NO. 1

NO.	Y POS.	AREA	MARK	%
1	8.7	1637.617		3.5
2	17.5	5873.27		12.8
3	26.7	9023.53		19.6
4	36.3	13385.44	U	29.2
5	46.0	15707.06	U	34.4
	TOTAL	45549.93		