

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Teh Hijau

Teh hijau merupakan jenis minuman yang berasal dari daun tanaman *Camelia sinensis*. Dalam pengolahannya, teh hijau merupakan daun teh yang diproses melalui pelayuan, pengukusan dan penggulangan namun tanpa melalui proses fermentasi tanpa melalui fermentasi. Ada beberapa proses dalam pengolahan teh hijau. Tahap pertama yaitu daun dipetik kemudian dilakukan proses pelayuan terhadap daun teh. Proses ini berfungsi untuk melenturkan daun agar mudah saat dilakukan proses gulung. Proses ini juga berfungsi untuk mengeluarkan aroma dan sebagai oksidasi sebagian. Waktu proses pelayuan tergantung pada jenis teh yang akan dibuat. Proses pelayuan teh hijau dilakukan selama 8-10 jam. Setelah proses pelayuan, dilakukan proses penguapan/Steaming pada suhu 100°C. Proses ini berfungsi untuk mencegah proses oksidasi dengan menonaktifkan enzim. Proses ini sangat penting untuk pembuatan teh hijau yang pada prosesnya tidak diperlukan oksidasi. Proses selanjutnya yaitu proses penggulangan daun yang berfungsi untuk melepaskan minyak pada teh. Proses terakhir yaitu proses pengeringan. Proses ini mencegah pertumbuhan mikroorganisme (Kosińska & Andlauer., 2014). Proses pengolahan teh mempengaruhi kandungan senyawa dalam teh tersebut.

Teh hijau mengandung berbagai macam senyawa seperti polifenol, asam organik, asam amino, metilsantin, karbohidrat, mineral, senyawa *volatile* dan vitamin. Dalam teh hijau, Polifenol merupakan kandungan paling besar dibandingkan dengan senyawa lain (Tabel 2.1). Kelompok polifenol yang paling banyak terkandung dalam teh hijau adalah catechin. Catechin terdiri dari berbagai jenis seperti *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC) dan *epigallocatechin-3 gallat* (EGCG). Teh hijau mengandung EC sebesar 6,4% , ECG sebesar 13,6% , EGC sebesar 19% dan EGCG

sebesar 59% (Rady *et al.*, 2018).

Kadar EGCG yang terkandung dalam teh hijau lebih besar dibandingkan dengan jenis teh lainnya. Seperti pada penelitian Ning dkk tahun 2016, kadar semua jenis catechin dianalisis pada beberapa jenis teh seperti teh hijau, teh hitam, teh putih, teh oolong, teh kuning dan teh *dark*. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa kadar EGCG teh hijau > EGCG teh kuning > EGCG teh oolong > EGCG teh putih > EGCG teh hitam > EGCG teh *dark* (Tabel 2.2). Hal inilah yang mendasari penggunaan teh hijau pada penelitian ini

Tabel 2. 1 Kandungan Senyawa Teh Hijau

No	Kelompok Molekul	Komponen	Kandungan dalam Seduhan teh Hijau Kering (%)
1	Polifenol	Catechin (<i>Epicatechin</i> , <i>Epicatechin-3-Gallat</i> , <i>Epigallocatechin</i> dan <i>Epigallocatechin-3-gallat</i>)	30-42%
		<i>Flavonols</i> (Kaemferol, Quercetin dan Myricetin)	5-10%
		<i>Deposides</i> (Theogallin, Asam Clorogenik, dan Asam Coumarylquinic)	2-4%
2	Asam Organik	Asam Askorbat	1-2%
		Asam Gallic	0,5%
		Asam Quinic	2%
		Asam Folat	0,5%
		Asam Organik lain	4-5%
3	Asam Amino	<i>Theanine</i>	4-6%
		Asam γ -aminobutyric	2-4%
4	Metilxantin	Kafein, Theobromin, Theophyllin	7-10%
5	Karbohidrat	Glikosida	10-15%
6	Mineral	Alumunium, Florin, Magnesium, Besi, Magnesium, Kalium, Fosfor, Zinc, Selenium dan Natrium	6-8%
7	Senyawa Volatil		0,02-1%

(Rady *et al.*, 2018)

Tabel 2. 2 Kadar Catechin dari beberapa jenis teh

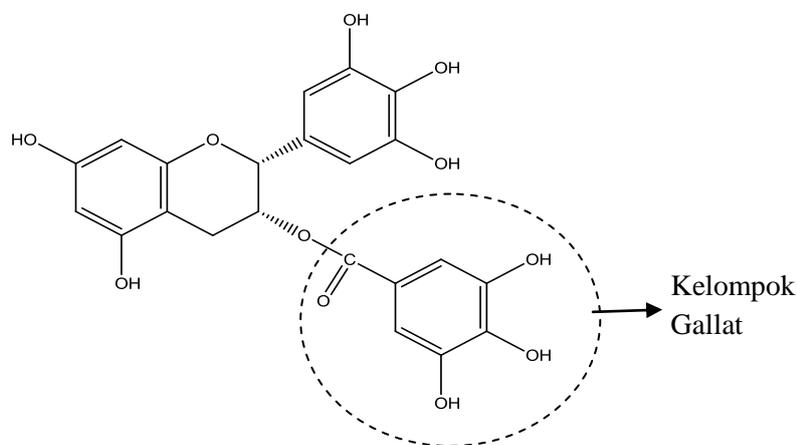
Komposisi kimia	Teh Hijau (%)	Teh Hitam (%)	Teh Putih (%)	Teh Oolong (%)	Teh Kuning (%)	Teh Dark (%)
EGC	2,19~3,47	0,35~0,83	0,59~1,07	1,94~2,92	1,23~2,41	0,35~0,85
+C	0,04~0,14	0,01~0,05	0,09~0,33	0,05~0,10	0,05~0,10	0,02~0,06
EC	0,59~1,05	0,19~0,48	0,27~0,47	0,59~0,79	0,35~0,81	0,12~0,32
EGCG	6,03~8,47	0,39~1,31	3,24~5,84	3,76~6,18	4,17~6,75	0,31~0,87
ECG	1,29~2,63	0,42~0,92	0,87~2,03	0,92~1,44	1,69~2,79	0,13~0,33

(Ning *et al.*, 2016)

Pada penelitian ini digunakan teh hijau dengan merk lokal. Teh hijau yang digunakan dibuat dari teh (*Camellia Sinensis*) asli tanpa campuran senyawa aktif lainnya dan diekstraksi sedemikian rupa sehingga memiliki kandungan (-)-epigallocatekingallat (EGCG) yang tinggi.

2.2 EGCG

2.2.1 Struktur EGCG



Gambar 2. 1 Struktur EGCG

EGCG ((-)-*Epigallocatechin-3-Gallat*) atau dengan nama lain ([[(2R,3R)-5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate) (Gambar 2.1). EGCG mengandung 3 cincin *heterocyclic* (A, B and C) dan gugus pada EGCG yang mampu menangkap senyawa radikal adalah gugus *trihydroxil* pada cincin B dan kelompok gallat pada posisi ke-3 pada cincin C (Davinelli *et al.*, 2012). Cincin A merupakan *meta-*

5,7 *-dihydroxy*, Cincin B dan D adalah *tryhydroxy phenol*. Karena adanya gugus hidroksi pada cincin A, B dan D menyebabkan EGCG berpotensi sebagai senyawa antioksidan (Shuang *et al.*, 2014). Kelompok gallat berperan penting dalam menghambat sintesis asam lemak sehingga dapat menghambat pertumbuhan kanker pada sel manusia (Mereles & Hunstein, 2011)

2.2.2 Sifat Fisika dan Kimia EGCG

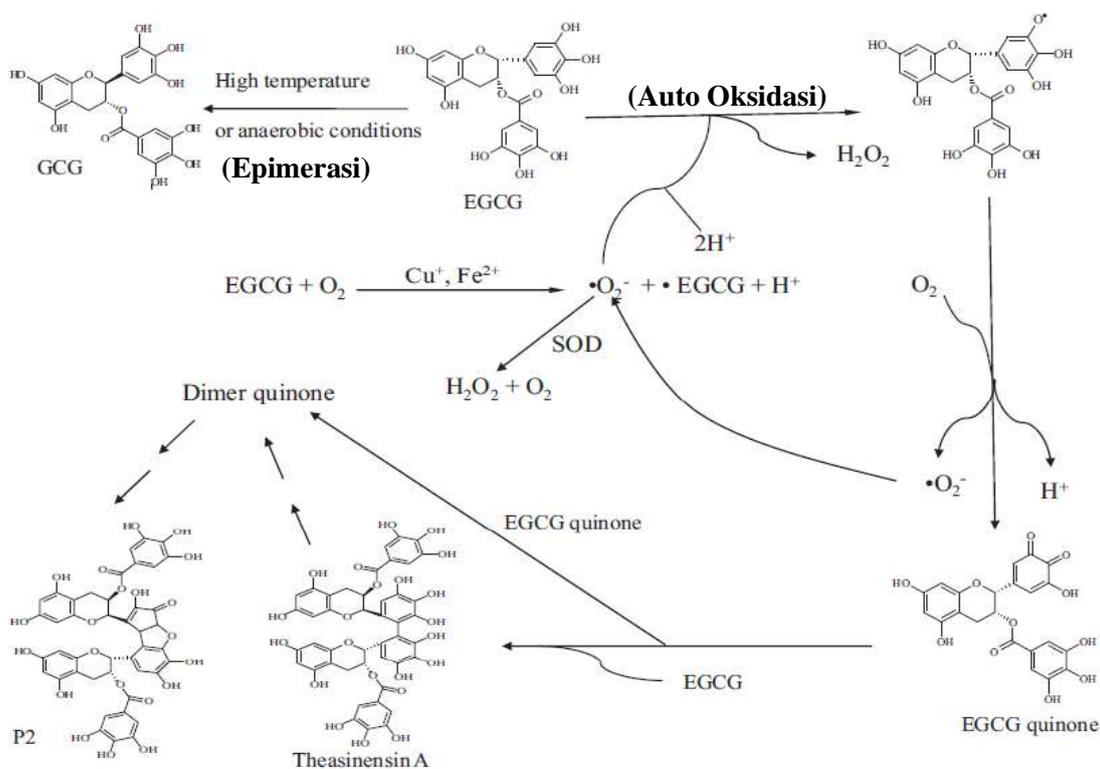
EGCG memiliki rumus molekul $C_{22}H_{18}O_{11}$ dengan struktur molekul. Massa molekul relative EGCG sebesar 458,4 g/mol dengan titik leleh sebesar 218°C (Sigma Aldrich). EGCG merupakan jenis senyawa polar karena dapat larut dalam air, metanol dan etanol, namun tidak dapat larut dalam kloroform (Shukla *et al.*, 2018). EGCG larut dalam air setidaknya 5 mg/ml dengan membentuk larutan kuning jernih (Sigma Aldrich). EGCG memiliki daya antioksidan paling besar dibandingkan dengan jenis catechin lainnya. EGCG mempunyai % penghambat sebesar $73,7 \pm 1,2$ pada kadar EGCG 5 µg/ml (Wu *et al.*, 2011). EGCG memiliki nilai log P sebesar 0,39 (Manai *et al.*, 2017). Log P atau konstanta partisi merupakan logaritma rasio konsentrasi molekul terlarut (EGCG) dalam satu sistem dengan dua pelarut yang tidak saling larut seperti campuran pelarut organik dengan pelaut air (Bannan *et al.*, 2017). Log P semua jenis katekin teh dapat dilihat pada tabel dibawah. Secara fisik EGCG berbentuk serbuk putih dengan rasa yang sedikit sepat dan pahit. EGCG juga peka terhadap cahaya (Zeng *et al.*, 2018). EGCG merupakan senyawa yang tidak stabil terutama dalam pelarut air sehingga mudah terdegradasi menjadi senyawa lain

Tabel 2. 3 Nilai log P senyawa antioxidant teh hijau

Antioxidants	LogP
Catechin	0.31
Epicatechin	0.11
Gallocatechin	-0.32
Epigallocatechin	-0.50
Catechin gallate	1.55
Epicatechin gallate	1.06
Gallocatechin gallate	0.92
Epigallocatechin gallate	0.39

2.3 Degradasi EGCG

EGCG mudah terdegradasi membentuk senyawa lain seperti Theasinensin A dan *Gallocatechin Gallat* (GCG). Degradasi tersebut umumnya disebabkan oleh dua jenis reaksi yaitu epimerasi dan auto oksidasi. Dua jenis reaksi tersebut terjadi karena disebabkan oleh beberapa hal seperti pH, suhu dan konsentrasi EGCG dalam produk teh.



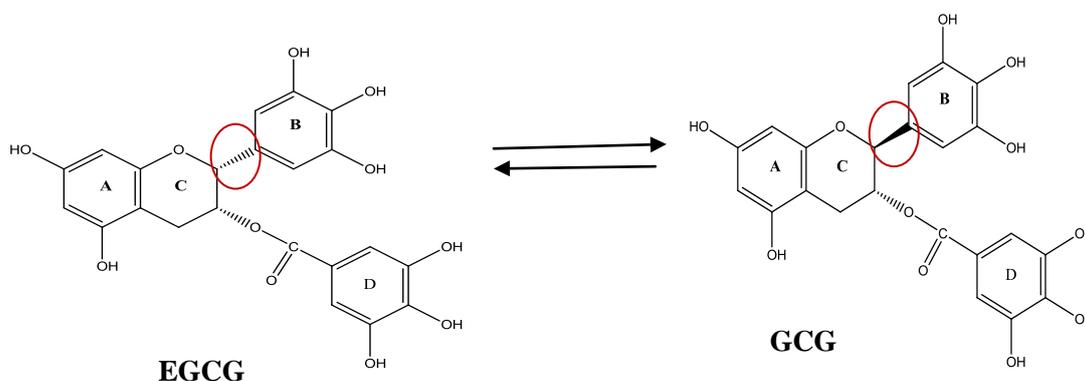
Gambar 2. 2 Mekanisme epimerasi dan auto oksidasi EGCG

(Sang *et al.*, 2011)

2.2.3.1 Auto Oksidasi

Senyawa EGCG dalam larutan cepat mengalami auto oksidasi yang mengakibatkan hilangnya atom hidrogen sehingga membentuk intermediet EGCG radikal, superoksida dan pembentukan produk teroksidasi kuinon (Gambar 2.2). Hasil auto oksidasi ini akan merusak sel dan jaringan tubuh. EGCG akan teroksidasi membentuk EGCG quinon. Kemudian, EGCG quinon akan bereaksi kembali dengan EGCG dapat membentuk dimer quinon dan theasinensin A. Theasinensin A kemudian juga dapat membentuk dimer quinon yang nantinya dapat membentuk senyawa dimer lain (Sang *et al.*, 2011). Theasinensin A merupakan produk utama hasil reaksi auto oksidasi dalam kondisi larutan basa dan konsentrasi EGCG yang sangat kecil (mikromolar). Degradasi EGCG akibat auto oksidasi ditandai dengan perubahan warna larutan dari bening menjadi coklat. Hal tersebut menunjukkan adanya struktur dengan berat molekul yang lebih besar yaitu polimerisasi dimer EGCG (Krupkova *et al.*, 2016).

2.2.3.2 Epimerasi



Gambar 2. 3 Epimerasi EGCG

Epimerasi merupakan reaksi perubahan EGCG menjadi *gallocatechin gallate*(GCG) (Gambar 2.3). GCG merupakan jenis *trans*-katekin. Reaksi ini biasanya terjadi karena proses penyeduhan, namun juga bisa terjadi saat penyimpanan. Reaksi epimerasi terjadi ketika pH larutan < 5,5, kandungan EGCG yang tinggi dan suhu > 50°C. Epimerasi ini dapat dicegah dengan cara penambahan senyawa antioksidan. Degradasi EGCG menjadi

GCG lebih disukai dibandingkan theasinensin A. Hal ini karena GCG merupakan senyawa yang tidak toksik, memiliki aktivitas biologis yang hampir sama dengan kelompok cis dan dapat kembali lagi membentuk EGCG (reversible) (Krupkova *et al.*,2016)

2.2.4 Faktor Stabilitas EGCG

2.2.4.1 Suhu Penyimpanan

Suhu penyimpanan mempengaruhi stabilitas EGCG dalam teh hijau. Konsentrasi EGCG 0,3 mg/ml dalam air yang disimpan pada suhu ruang selama 2,5 jam, kadar EGCG akan menurun dari 99,6% menjadi 81,7%. Namun, jika disimpan pada suhu 4°C selama 2 jam, kadar EGCG akan turun dari 99,5% menjadi 99,3% (Sigma Aldrich). Krupkova *et al* tahun 2016 menyebutkan EGCG dengan kadar 109 mM memiliki waktu simpan ($t_{1/2}$) selama 7 hari pada suhu penyimpanan 4°C, namun jika disimpan pada suhu ruang hanya memiliki waktu simpan selama 2 hari. Pada penelitian Wang *et al* tahun 2008 menjelaskan bahwa pada suhu $\geq 44^\circ\text{C}$ dan $\geq 98^\circ\text{C}$, perubahan dari GCG menjadi EGCG lebih dominan dibandingkan dengan reaksi degradasi EGCG. Sehingga EGCG lebih stabil pada suhu $\geq 44^\circ\text{C}$ dan $\geq 98^\circ\text{C}$. Penelitian Zeng *et al* tahun 2016 menjelaskan bahwa EGCG paling stabil jika disimpan pada suhu 4°C dan 25°C. Berdasarkan survey lapangan, penyimpanan teh hijau pada suhu 4°C lebih memungkinkan dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 44°C

2.2.4.2 pH

Jenis pH larutan dapat mempengaruhi stabilitas EGCG. Berdasarkan beberapa penelitian kondisi pH yang baik untuk stabilisasi EGCG yaitu pH antara 2-5,5. Pada kondisi pH < 2 dan pH > 5,5 dengan suhu lebih dari 50°C, EGCG akan mengalami auto oksidasi membentuk Theasinensin A. Theasinensin A merupakan senyawa dimer yang tidak memiliki sifat seperti EGCG. Sedangkan pada pH = 2-5,5 dengan suhu lebih dari

50°C dan dengan tambahan antioksidan, EGCG akan mengalami epimerasi membentuk *Gallocatechin Gallate* (GCG). GCG merupakan senyawa yang tidak toksik dan memiliki aktivitas hampir sama dengan kelompok cis serta mudah terbentuk EGCG kembali atau reversible (Krupkova *et al.*, 2016). Beberapa penelitian lainnya menyebutkan bahwa EGCG lebih stabil jika membentuk pH < 7 (Zeng *et al.*, 2017), pH sekitar 4 (Li *et al.*, 2012) dan pH < 3 (Saadeh *et al.*, 2009). Berdasarkan data diatas dapat disimpulkan bahwa larutan EGCG stabil pada kondisi asam $2 < \text{pH} < 5$.

2.2.4.3 Metode Penyeduhan

Metode penyeduhan mempengaruhi stabilitas EGCG. Jenis metode penyeduhan yang dipilih akan mempengaruhi kadar EGCG yang diperoleh. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi EGCG maka semakin lama waktu paruhnya. Pada penelitian Fangueiro tahun 2014 menjelaskan bahwa setelah penyimpanan selama 2 hari pada suhu kamar, konsentrasi EGCG 54,5 µM sepenuhnya terdegradasi sedangkan EGCG dengan konsentrasi 1,97 mM hanya terdegradasi sebesar 80% dari konsentrasi awal. Penelitian lainnya menjelaskan bahwa, setelah 7 hari penyimpanan, EGCG 0,5 mM terdegradasi hingga hanya menjadi 80%, sementara larutan EGCG dengan konsentrasi 7mM memperoleh kadar EGCG yang tetap stabil (Sang *et al.*, 2005). Sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar EGCG dalam minuman teh harus tinggi untuk membantu stabilisasi.

Metode penyeduhan teh hijau yang digunakan mempengaruhi kadar EGCG yang terkandung dalam teh hijau. Ada beberapa jenis metode penyeduhan daun teh seperti ekstraksi statis, ekstraksi dinamis, ekstraksi ultrasonic, ekstraksi agitasi dan ekstraksi konvensional (penyeduhan biasa). Dari berbagai jenis ekstraksi tersebut, digunakan ekstraksi ultrasonic pada penelitian ini. Hal tersebut dipilih karena hasil kadar EGCG yang diperoleh cukup tinggi dibandingkan dengan jenis ekstraksi lainnya (Tabel 2.4). Semua

jenis ekstraksi ini dilakukan dengan menggunakan pelarut air. Hal tersebut dikarenakan air merupakan salah satu jenis pelarut polar yang aman untuk dikonsumsi.

Tabel 2. 4 Kadar EGCG dari berbagai jenis Ekstraksi

No	Jenis Ekstraksi				Referensi
		Kelebihan	Kekurangan	Kadar EGCG	
1	Ekstraksi Statis	- Suhu yang digunakan 50-90 °C	- Butuh gelas kondensor - Butuh saringan 300 mesh - Waktu ekstraksi 1-40 menit - Butuh daun teh 150 g	- 3,22 mg/ml untuk 150 g daun teh - 0,021 mg/ml untuk 1 gram daun teh	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
2	Ekstraksi Dinamis	- Suhu yang digunakan 50-90 °C	- Waktu ekstraksi 20-40 menit - Butuh pompa - Butuh saringan 300 mesh - Butuh kondensor dan kolom ekstraksi - Butuh daun teh 150 g	- 6,97 mg/ml untuk 150 g daun teh - 0,046 mg/ml untuk 1 gram daun teh	(Xu <i>et al.</i> , 2018)
3	Ekstraksi Ultrasonik	- Suhu yang digunakan 80°C - Waktu ekstraksi 20 menit - Hanya butuh 1 gram daun teh	- Butuh ultrasonic bath	39,0 mg/g kering atau 0,39 mg/L	(Das & Eun, 2018) (Ayyildiz <i>et al.</i> , 2018)
4	Ekstraksi Konvensional (Penyeduhan)	- Proses pengerjaan simpel	-	15,3 mg/g kering 0,153 mg/L	(Das & Eun, 2018)

2.2.4.4 Penggunaan wadah penyimpanan tanpa cahaya

Pada penelitian Zeng *et al* tahun 2018 menjelaskan bahwa sinar matahari dan udara dapat mempengaruhi stabilitas larutan EGCG. Pada penelitian ini dilakukan pengujian pada larutan EGCG dengan konsentrasi 2 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,15 mg/ml; 0,1 mg/ml dan 0,05 mg/ml. Setelah penyimpanan selama 48 jam, pada kondisi tanpa cahaya dan udara, % sisa kandungan EGCG pada masing-masing konsentrasi sebesar 100%, 65%, 63%, 40%

dan 21%. Sedangkan pada kondisi dengan cahaya dan udara, % sisa kandungan EGCG pada masing-masing konsentrasi sebesar 85%, 22%, 20%, 0% dan 0%. Hal ini menunjukkan bahwa jenis wadah penyimpanan juga mempengaruhi kadar EGCG. Sehingga perlu menggunakan wadah/botol penyimpanan yang tidak tembus cahaya dan udara.

2.2.4.5 Penambahan senyawa antioksidan

Antioksidan adalah zat kimia yang dapat mengganggu reaksi berantai dengan membentuk radikal yang kurang reaktif atau secara signifikan menurunkan jumlah radikal bebas sehingga efektif mencegah, menunda atau menghambat reaksi oksidasi. Menggabungkan antioksidan dari berbagai jenis mungkin menguntungkan karena dapat menyebabkan efek sinergis, meningkatkan efektivitas pengawet makanan dan mengurangi penggunaan antioksidan sintesis yang dapat menimbulkan masalah kesehatan. Efek sinergis, aditif dan antagonis telah ditemukan ketika lebih dari dua antioksidan dicampur bersama (Tsao., 2015)

Interaksi sinergis antioksidan adalah efek antioksidan dari dua atau lebih campuran antioksidan berbeda jenis lebih besar dari pada efek antioksidan individu yang diterapkan secara terpisah. Interaksi antioksidan aditif adalah efek antioksidan dari dua atau lebih campuran antioksidan berbeda jenis sama dengan efek antioksidan individu yang diterapkan secara terpisah dan interaksi antagonis antioksidan adalah efek antioksidan dari dua atau lebih campuran antioksidan berbeda jenis lebih kecil dari efek antioksidan individu yang diterapkan secara terpisah (Tsao., 2015). Penambahan antioksidan pada penelitian ini diharapkan terbentuk interaksi sinergis.

Tabel 2. 5 Potensial oksidasi reduksi radikal dan tipe antioksidan

Radikal dan tipe antioksidan	E° (mV)
HO●, H ⁺ /H ₂ O	2310
RO●, H ⁺ /ROH	1600
BHT ●, H ⁺ /BHT	1350
ROO●, H ⁺ /ROOH	1030
β-Carotene● ⁺ / β-Carotene	840
PUFA●, H ⁺ /PUFA-H	600
Ferulic acid●, H ⁺ /Ferulic acid	595
Catechin●, H ⁺ /Catechin	570
Chlorogenic acid●, H ⁺ /Chlorogenic acid	550
α-Tocopheroxyl●, H ⁺ / α-Tocopheroxyl	500
EGCG●, H ⁺ /EGCG	430
Quercetin●, H ⁺ /Quercetin	330
Ascorbate● ⁻ , H ⁺ /Ascorbate ⁻	282

(Tsao., 2015)

Efek sinergis terjadi karena perbedaan dalam potensial reduksi dari berbagai antioksidan dari satu sistem yang sama. Potensial reduksi-oksidasi atau redoks (E°) adalah hal yang sangat penting untuk diketahui pada senyawa antioksidan. Semakin besar beda potensial (ΔE) yang terbentuk maka interaksi antar dua antioksidan akan semakin sinergis. Sehingga daya antioksidan akan semakin meningkat. Potensial reduksi (E°) dari berbagai jenis antioksidan dapat dilihat pada tabel 2.5 (Tsao., 2015).

Berdasarkan Tabel 2.6, asam askorbat atau vitamin C dipilih karena beda potensial yang besar sehingga diharapkan membentuk efek sinergis yang baik dengan EGCG pada seduhan teh hijau. Efek sinergis antara vitamin C dan EGCG dapat mencegah terjadinya degradasi pada EGCG. Penambahan asam askorbat dapat meningkatkan stabilitas EGCG dengan meningkatkan waktu paruh. Selain karena perbedaan potensial reduksi, penambahan asam askorbat atau vitamin C didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa penambahan asam askorbat dapat meningkatkan aktivitas antioksidan (Tabel 2.6)

Tabel 2. 6 Manfaat Penambahan Asam Askorbat terhadap aktivitas EGCG

Sampel	Keterangan	Referensi
Sel paru-paru manusia (EGCG 4,90 $\mu\text{mol/L}$ + AA 30,62 $\mu\text{mol/L}$)	Penambahan asam askorbat pada EGCG dapat meningkatkan kemampuan penghambatan pada sel kanker paru-paru Sub G_0/G_1 EGCG = 52,2% Sub G_0/G_1 EGCG + AA = 60,0%	(Li <i>et al.</i> , 2010)
Krim kulit pelindung UV dengan kandungan EGCG + Vitamin C	% fotodegradasi EGCG = 78% % fotodegradasi EGCG + Vitamin C = 20%	(Scalia <i>et al.</i> , 2013)
EGCG standar dalam medium HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N0-2-ethanesulfonic acid)	pH 7,4 dengan AA : Day 2 pada konsentrasi 0,05; % EGCG = 60% pH 7,4 tanpa AA : Day 2 pada konsentrasi 0,05; % EGCG = 40% pH 3,5 dengan AA : Day 2 pada konsentrasi 0,05; % EGCG = 20% pH 3,5 tanpa AA : Day 2 pada konsentrasi 0,05; % EGCG = 0%	(Fungueiro <i>et al.</i> , 2014)

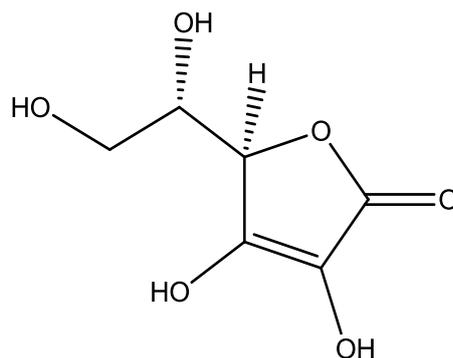
Berdasarkan Tabel 2.6 diketahui bahwa penambahan vitamin C atau asam askorbat dapat meningkatkan aktivitas EGCG. Vitamin C dapat meningkatkan aktivitas EGCG dalam menghambat sel kanker paru-paru (Li *et al.*, 2010) dan menghambat degradasi

EGCG dalam sinar UV (Scalia *et al.*, 2013) serta dapat menstabilkan EGCG standar dalam medium HEPES (Fungueiro *et al.*, 2014). Oleh sebab itu vitamin C atau asam askorbat dipilih sebagai tambahan dalam seduhan teh hijau yang banyak mengandung EGCG sehingga dapat meningkatkan aktivitas EGCG dalam tubuh

2.3 Asam Askorbat

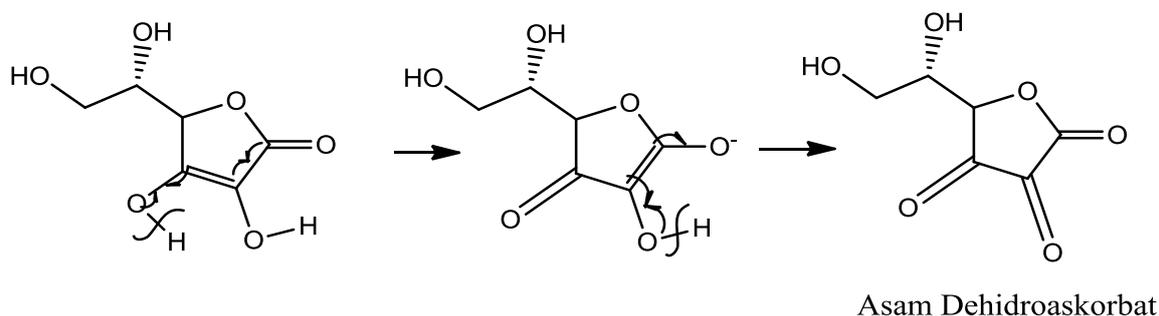
Asam askorbat atau yang biasa disebut vitamin C adalah bentuk enolik dari satu α -ketolakton. Larutan asam askorbat mudah teroksidasi menjadi bentuk diketon yang disebut asam dehidroaskorbat yang dengan mudah dapat diubah menjadi asam oksalat, asam diketogulonat atau asam treonat. Asam askorbat mempunyai nama IUPAC (R)-3,4-dihidroksi-5 - ((S) -1, 2-dihidroksietil) furan-2 (5H) dengan rumus molekul $C_6H_8O_6$ dan massa molekul relative (M_r) sebesar 176,13 g/mol (Jeanmonod *et al.*, 2018). Vitamin C atau asam askorbat (AA) mempunyai % penghambat sebesar $37,4 \pm 1,6$ pada konsentrasi AA 5 $\mu\text{g/ml}$ (Wu *et al.*, 2011). Titik leleh vitamin C sebesar 191°C . Kelarutan vitamin C dalam air sebesar 400 mg/ml pada suhu 40°C serta nilai Log P vitamin C adalah -2,34 (Chiret *et al.*, 2007). Asam askorbat atau vitamin C lebih stabil pada suhu rendah ($4-6^\circ\text{C}$) dibandingkan suhu kamar dalam waktu penyimpanan selama 7 hari (Klu *et al.*, 2016).

Struktur asam askorbat (Gambar 2.4) terdiri dari lakton dan dua enolic hidroksil serta alkohol primer dan alkohol sekunder. Struktur enolic hidroksil (enediol) merupakan bagian penting pada struktur asam askorbat sebagai antioksidan. Enediol dapat dioksidasi dengan mudah membentuk diketon (Gambar 2.5). Sehingga kelompok karbonil tetangganya mengalami reduksi. Asam askorbat juga terbentuk dari ikatan hidrogen (Garis putus-putus pada Gambar 2.5) yang berkontribusi besar terhadap stabilitas struktur (Jeanmonod *et al.*, 2018).



Gambar 2. 4 Struktur asam askorbat

Gambar 2.6 menjelaskan perubahan vitamin C atau asam askorbat menjadi asam dehidroaskorbat. Atom H terlepas karena pasangan elektron bebas pada atom O mengalami delokalisasi pada struktur cincin sehingga struktur cincin kelebihan elektron bermuatan negatif sedangkan pada atom O mengalami kekurangan elektron positif.



Asam Dehidroaskorbat

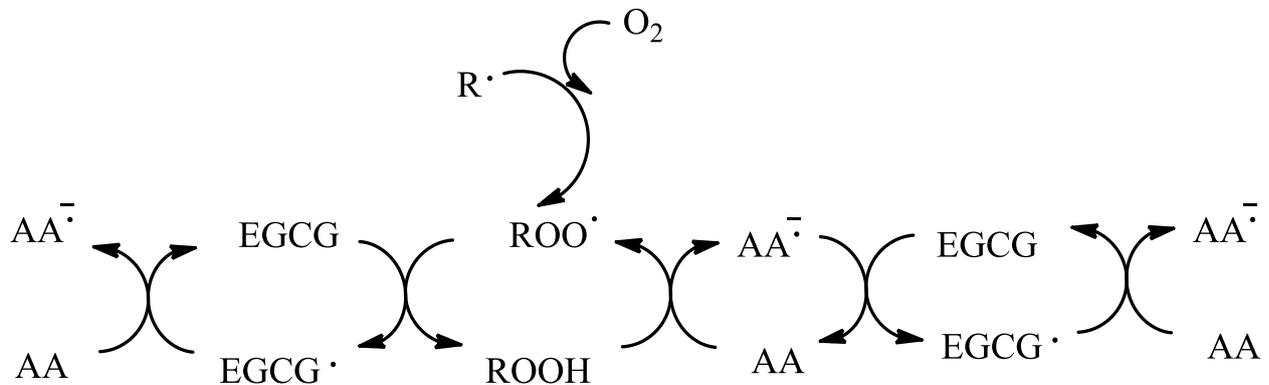
Gambar 2. 5 Mekanisme pembentukan Asam Dehidroaskorbat

(Lung & Destiani., 2014)

2.4 Mekanisme Vitamin C dalam Mencegah Degradasi EGCG

Asam askorbat (AA) atau Vitamin C merupakan salah satu jenis senyawa antioksidan alami yang diperoleh dari tanaman (Tsao., 2015). Senyawa antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat, mencegah atau menghilangkan aktivitas oksidasi pada molekul target (Shebis *et al.*, 2013). Dalam penelitian ini EGCG merupakan molekul target yang mudah mengalami oksidasi sehingga membentuk EGCG radikal (EGCG●) dan

senyawa hasil degradasi lainnya. Aktivitas oksidasi tersebut dicegah dengan menambahkan antioksidan lain seperti vitamin C atau asam askorbat (AA). AA digunakan sebagai agen pereduksi yang mendonasikan elektron kepada komponen yang teroksidasi.



Gambar 2. 6 Mekanisme efek sinergis antara AA dan EGCG

(Dai *et al.*, 2008)

AA akan teroksidasi melepas satu elektron membentuk AA radikal anion (AA•⁻) atau dehidroaskorbat acid. Elektron yang dilepas oleh AA akan ditangkap oleh EGCG radikal sehingga akan kembali menjadi EGCG (Dai *et al.*, 2008). Sedangkan elektron yang dilepas oleh EGCG akan mereduksi senyawa yang teroksidasi lainnya (ROO•) kembali membentuk senyawa yang tidak teroksidasi (ROOH). Asam Askorbat radikal anion akan membentuk asam oksalat dan asam trenoat. EGCG dengan vitamin C juga bisa bereaksi antagonis. Hal ini dibuktikan pada penelitian sebelumnya bahwa 80% pada kombinasi antioksidan mengalami interaksi sinergis dan 20% mengalami interaksi antagonis. Jenis interaksi yang terjadi tergantung dari jenis antioksidan yang dikombinasi (Hugo *et al.*, 2012). Pada penelitian ini akan mempelajari pengaruh penambahan asam askorbat (AA) terhadap stabilitas EGCG dan daya antioksidan seduhan teh hijau dengan menggunakan KLT-Densitometri untuk mengukur kadar EGCG dan menggunakan metode DPPH untuk mengukur daya antioksidan.

2.5 Penentuan Kadar EGCG

2.5.1 Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu cara yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam suatu campuran pada lempeng kromatografi (Sherma & Fried., 2003). Pemisahan senyawa didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak merambat pada fase diam karena adanya gaya kapilaritas. Fase diam yang digunakan pada KLT biasanya berupa plat silika sedangkan fase gerak dapat menggunakan pelarut organik tunggal ataupun campuran pelarut organik (Wulandari., 2011).

2.5.1.1 Pemilihan Fase gerak (Eluen)

Pemilihan fase gerak merupakan faktor yang paling berpengaruh pada sistem KLT. Fase gerak dapat terdiri satu pelarut atau campuran dua sampai enam pelarut. Campuran pelarut harus saling campur dan tidak ada tanda-tanda kekeruhan. Fungsi fase gerak atau eluen dalam KLT untuk melarutkan campuran zat, untuk mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga noda memiliki R_f dalam rentang yang dipersyaratkan serta untuk memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang dipisahkan (Wulandari., 2011).

Pemilihan fase gerak yang cocok dapat dilakukan melalui tahapan optimasi fase gerak. Optimasi fase gerak diawali dengan menentukan sifat fisika dan kimia analit yang akan dianalisis dan jenis sorben (fase diam) yang digunakan. Pada sorben dengan prinsip pemisahan berdasarkan polaritas seperti silika gel dibutuhkan nilai log P dan tetapan disosiasi (pK_a) analit dalam penentuan eluen. Nilai koefisien partisi analit digunakan untuk menentukan afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak. Nilai tetapan disosiasi (pK_a) digunakan untuk menentukan bentuk analit (ion atau molekul) pada pH dibawah

pKa, analit akan berbentuk molekul. Bila analit berada pada pH diatas pKa, analit berbentuk ion. Saat analit berbentuk molekul afinitas analit terhadap fase diam dan fase gerak akan sesuai dengan nilai koefisien partisinya tetapi ketika analit berbentuk ion maka analit bersifat polar atau sebagian besar larut dalam pelarut polar dan hampir tidak larut dalam pelarut non polar. Pada Tabel 2.7 menunjukkan beberapa pelarut yang paling sering digunakan dalam KLT, disertai dengan nilai log P yang dapat digunakan sebagai acuan pemilihan eluen (Wulandari., 2011).

Tabel 2. 7 Nilai K dan Log P Pelarut

Pelarut	k (mm ² /s)	Log P
n-heptana	11,4	3,42
n-heksana	14,6	3,0
n-pentana	13,9	2,58
Sikloheksan	6,7	2,5
Toluene	11,0	2,52
Kloroform	11,6	1,67
Diklormetan	13,2	1,01
Diisopropil eter	13,2	1,4
Tert-Butanol	1,1	0,6
Dietil eter	15,3	0,76
Isobutanol	1,6	0,95
Asetonitril	15,4	0,17
Isobutil metil keton	9,1	1,6
2-propanol	2,5	0,38
Etil asetat	12,1	0,29
1-propanol	2,9	0,55
Etilmetil keton	13,9	2,34
Aseton	16,2	0,2
Etanol	4,2	0,07
1,4 dioksan	6,5	-0,31
Tetrahidrofuran	12,6	0,4
Metanol	7,1	-0,27
Piridin	8,0	0,7
Sorben	Lempeng KLT silika gel 60 F254	
Tipe chamber	(Merck) Chamber N dengan	
Temperatur kamar	penjenuhan	
Jarak migrasi pelarut	22°C	
	100mm	

(Wulandari., 2011)

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yaitu kloroform : aseton : asam format (Vasisht *et al.*, 2003) dengan perbandingan yang berbeda-beda. Kloroform : aseton : asam format (10:8:3), kloroform : aseton : asam format (10:8:2) dan kloroform : aseton : asam format (10:8:1)..

2.5.1.2 Parameter Pemisahan

Parameter pemisahan yang baik dapat dilihat pada nilai R_f . R_f adalah hasil bagi antara jarak migrasi senyawa dengan jarak migrasi fase gerak.

$$R_f = \text{Jarak migrasi senyawa} / \text{jarak migrasi fase gerak}$$

Faktor-faktor yang paling menentukan harga R_f adalah ketebalan fase diam, kadar fase gerak dan fase diam, derajat kejenuhan bejana kromatografi oleh pelarut pengembang (fase gerak) dan banyaknya sampel yang ditotolkan (Skoog., 1998). Harga R_f berkisar antara 0-0,9999 . Pada KLT- densitometri R_f yang baik berada pada kisaran 0,2-0,8 (Sherma & Fried., 2003). Parameter pemisahan lainnya adalah resolusi analit (R_s)

Resolusi atau derajat keterpisahan (R_s) merupakan pemisahan kedua noda senyawa dengan sempurna hingga garis dasarnya. R_s analit dengan analit yang lain sebaiknya $>1,25$ (Spangenberg *et al.*, 2011)

$$R_s = 2(R_f A \text{ max} - R_f B \text{ max}) / ((R_f A \text{ akhir} - R_f A \text{ awal}) + (R_f B \text{ akhir} - R_f B \text{ awal}))$$

Keterangan :

$R_f A$ = R_f pada analit A $R_f B$ = R_f senyawa yang paling dekat dengan analit A

R_s = Resolusi

Pengamatan noda hasil pemisahan pada kromatogram dapat disesuaikan berdasarkan analit. Analit pada penelitian ini berupa EGCG. Noda EGCG pada plat KLT dapat dilihat dibawah sinar UV 254 nm. Untuk mengetahui kadar EGCG pada sampel yang dianalisis, maka digunakan instrumen densitometer.

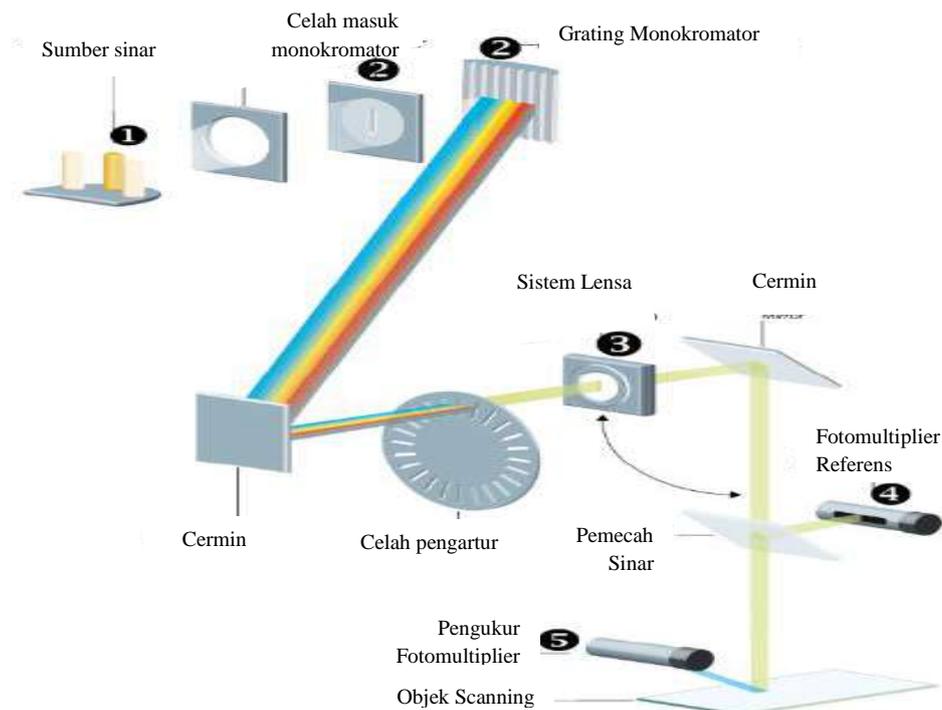
2.5.2 Densitometer

Densitometri merupakan analisis instrumental penentuan analit secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik (REM) dengan noda analit pada fase diam KLT. Metode ini biasa disebut metode KLT-Densitometri. Penentuan kualitatif analit KLT-Densitometri dilakukan dengan cara membandingkan nilai R_f analit dan standar. Noda analit yang memiliki R_f sama dengan standar diidentifikasi kemurnian analit dengan cara membandingkan spektrum densitometri analit dan standar. Sedangkan penentuan kuantitatif analit dilakukan dengan cara membandingkan luas area noda analit dengan luas area noda standar pada fase diam yang telah diketahui konsentrasinya atau dengan cara menghitung densitas noda analit dan membandingkannya dengan densitas noda standar (Wulandari., 2011).

Interaksi radiasi elektromagnetik (REM) merupakan intensitas cahaya yang mengenai molekul senyawa dalam noda. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan noda pada fase diam KLT menentukan intensitas cahaya yang diabsorpsi, ditransmisi, dipantulkan (refleksi) oleh noda analit dan intensitas REM semula. Apabila pada fase diam tidak ada noda, maka cahaya yang jatuh akan dipantulkan kembali. Tetapi jika cahaya tersebut dijatuhkan pada pelat yang terdapat noda dari suatu senyawa, maka sebagian cahaya akan diserap dan intensitas yang dipantulkan akan berbeda dengan intensitas cahaya yang datang (Wulandari., 2011).

Skema sistem optic densitometer dapat dilihat pada Gambar 2.8. Sumber radiasi yang digunakan dapat dipilih yaitu sinar UV (lampu deuterium) pada panjang gelombang 200-400 nm, sinar visible (lampu tungsten) pada panjang gelombang 400-700 nm dan sinar fluoresensi (lampu merkuri). Sinar yang dipancarkan berupa sinar polikromatik kemudian masuk melewati celah monokromator. Didalam monokromator sinar didispersikan menjadi sinar monokromatik dengan teknik grating. Sinar monokromatik dengan panjang gelombang terpilih akan dipantulkan melalui cermin sehingga mengenai objek (lempeng KLT). Sinar yang datang dapat direfleksikan maupun diteruskan. Sinar yang direfleksikan dan diteruskan ditangkap oleh pengganda foton (photomultiplier) berfungsi mengandakan sinar yang datang sehingga dihasilkan elektron yang terbaca oleh sistem computer sebagai data output (Wulandari., 2011).

Untuk mengetahui kadar EGCG dalam seduhan teh hijau, dapat dilakukan analisis kuantitatif dengan cara membuat kurva linieritas terlebih dahulu dengan minimal 5 konsentrasi standar EGCG, hingga diperoleh persamaan linier ($y=ax+b$). Dimana y merupakan luas area dan x merupakan kadar EGCG. Pesamaan linier tersebut kemudian digunakan untuk menentukan kadar EGCG dalam sampel seduhan teh hijau. Luas area yang muncul pada sampel, dimasukkan pada persamaan linier dan dihitung nilai x (kadar EGCG).



Gambar 2. 7 Skema Kerja Densitometer

Sumber :

(www.camag.com/en/tlc_hptlc/products/evaluation_documentation_tlc-ms_biolumine/science/tlc_scanner_4.cfm)

2.6 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Antioksidan, terutama yang mampu mencegah efek radikal bebas dalam tubuh manusia dan kerusakan produk makanan semakin diminati oleh industri dan peneliti. Khususnya, antioksidan yang berasal dari alam bukan dari sumber sintesis. Meningkatnya penggunaan antioksidan alami menyebabkan dibutuhkan metode pengujian efisiensi antioksidan dari substansi tersebut. Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan seduhan teh hijau (Tabel 2.6).

Berdasarkan Tabel 2.8, metode DPPH dipilih pada uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini karena lebih simple dan sesuai dengan senyawa antioksidan yang akan diukur.

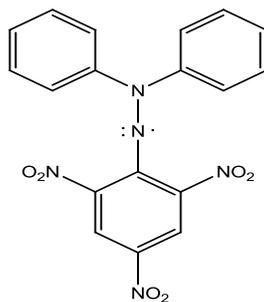
Tabel 2. 8 Beberapa metode pengujian daya antioksidan

Metode	Keuntungan	Kekurangan	Referensi
DPPH(<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i>)	<ul style="list-style-type: none"> a. Analisis cepat dan sederhana b. Cocok untuk senyawa yang memiliki panjang gelombang tidak mendekati 517 nm 	<ul style="list-style-type: none"> a. Tidak bisa digunakan untuk mengukur antioksidan hidrofobik 	(Alam & Bristi, 2013)
FRAP (<i>Ferric Reducing Antioksidan Power</i>)	<ul style="list-style-type: none"> a. Analisis Sederhana, cepat, murah, memiliki ketahanan yang baik b. Tidak memerlukan instrument khusus 	<ul style="list-style-type: none"> a. Pelarut yang digunakan lebih banyak b. Tidak cocok untuk antioksidan tiol, seperti glutathione c. Hanya mengukur kemampuan reduksi berdasarkan ion besi, yang tidak relevan dengan aktivitas antioksidan secara mekanis dan fisiologis 	(Rock & Brunswick, 2005)
TPC (<i>total phenolic content</i>)		<ul style="list-style-type: none"> a. Hanya mengukur antioksidan senyawa fenol 	(Rock & Brunswick, 2005)
DPPH-HPLC	<ul style="list-style-type: none"> a. Akurat b. Cocok untuk mengukur aktifitas antioksidan vitamin C 	<ul style="list-style-type: none"> a. Membutuhkan waktu lebih lama untuk analisis b. Membutuhkan pelarut pro-HPLC yang mempunyai harga mahal 	(Kumara <i>et al.</i> , 2018)

2.6.1 Metode DPPH

DPPH atau *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* atau α, α -*difenil- β -pikrilhidrazil* merupakan molekul radikal bebas yang sangat stabil (Gambar 2.8). DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat

pada panjang gelombang 517 nm dengan warna ungu gelap. Pengambilan elektron dari suatu senyawa menyebabkan molekul DPPH tidak lagi menjadi molekul radikal dikarenakan elektron radikal telah berpasangan. Hal tersebut menyebabkan warna ungu menghilang dan itu sebanding dengan elektron yang diambil oleh DPPH. Reaksi antara DPPH dan antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.9 (Alam & Bristi., 2013)

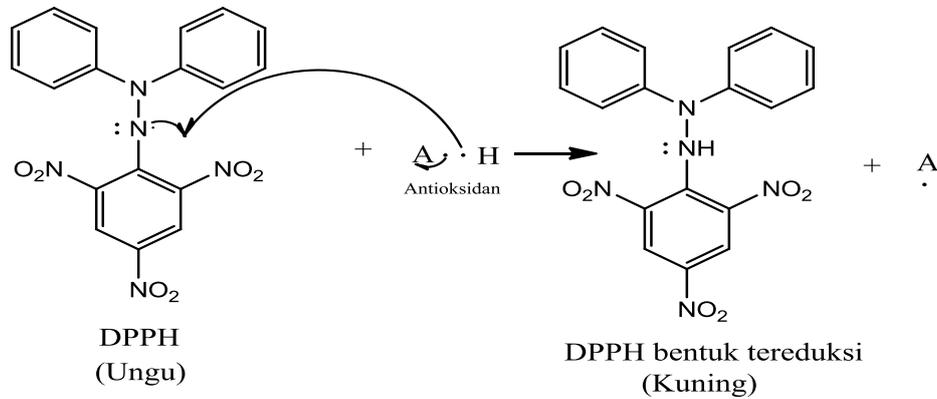


Gambar 2. 8 Struktur DPPH

Satu molekul DPPH dapat mereduksi satu gugus hidroksil pada molekul antioksidan. Pada vitamin C, 2 molekul DPPH dapat mereduksi 1 molekul vitamin C. Hal tersebut dikarenakan vitamin C memiliki 2 gugus hidroksil. Pada kasus yang lain, 8 molekul DPPH dapat mereduksi 1 molekul EGCG. Hal tersebut dikarenakan molekul EGCG memiliki 8 gugus hidroksil. Untuk mengetahui kekuatan antioksidan dapat diketahui dengan menghitung % peredaman antioksidan terhadap DPPH dengan menggunakan rumus persamaan (1). Absorbansi kontrol merupakan nilai absorbansi DPPH dan Absorbansi standar merupakan absorbansi DPPH + Antioksidan (Kumara *et al.*, 2018).

Aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC_{50} . IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) merupakan nilai konsentrasi antioksidan yang menyebabkan kehilangan 50% aktivitas DPPH. IC_{50} dapat digunakan sebagai parameter untuk membandingkan aktivitas beberapa jenis antioksidan. Nilai IC_{50} dapat diketahui dengan

cara membuat kurva hubungan antara konsentrasi antioksidan dengan nilai % penghambat (Kumara *et al.*, 2018)

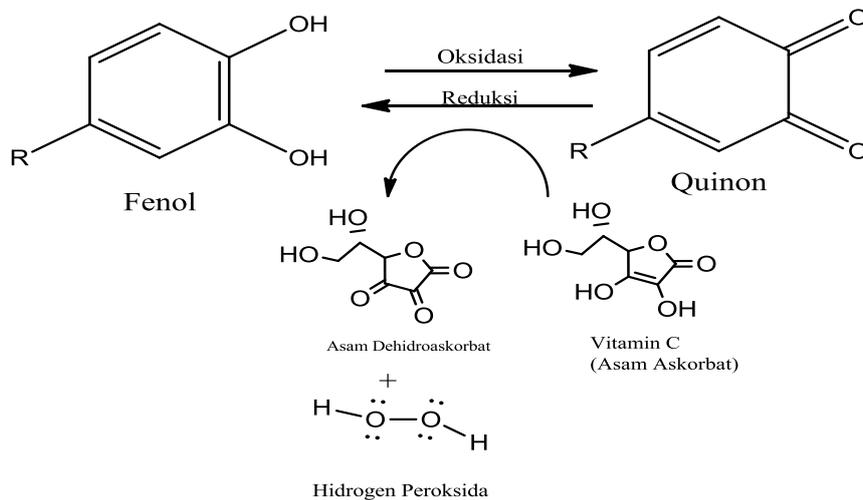


Gambar 2. 9 Reaksi DPPH dengan antioksidan

(Alam & Bristi, 2013)

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Standar}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

2.6.2 Mekanisme Stabilitas Aktivitas Antioksidan oleh Vitamin C



Gambar 2. 10 Mekanisme Stabilitas Antioksidan oleh Vitamin C

(Toit., 2006)

Senyawa antioksidan pada seduhan teh hijau sebagian besar berasal dari kelompok polifenol. Banyaknya kandungan polifenol akan mempengaruhi aktivitas antioksidan pada

seduhan teh hijau. Aktivitas antioksidan akan menurun jika kandungan polifenol mengalami degradasi membentuk senyawa lain. Untuk menstabilkan aktivitas antioksidan pada seduhan teh hijau maka ditambah dengan vitamin C untuk mencegah terjadinya reaksi oksidasi pada senyawa fenol. Seperti pada Gambar 2.11, Hasil oksidasi dari senyawa fenol (Quinon) akan direduksi kembali menjadi senyawa fenol oleh asam askorbat. Vitamin C atau asam askorbat akan teroksidasi membentuk asam dehidroaskorbat dengan melepaskan $2H^+$ (Gambar 2.6) yang kemudian bereaksi dengan ikatan rangkap pada O dari senyawa kuinon, sehingga senyawa tersebut tereduksi membentuk senyawa fenol kembali.

2.7 Penentuan Kadar Vitamin C dengan Titrasi Iodometri

Titration Iodometri merupakan metode yang digunakan untuk menentukan kadar vitamin C dalam ekstrak buah delima dan ekstrak buah manggis. Pada metode ini, penentuan vitamin C menggunakan metode titrasi redoks dengan menggunakan kalium iodat (KIO_3) dan kalium iodida (KI). Ketika ion iodat (IO_3^-) ditambahkan pada larutan asam yang mengandung ion iodida (I^-) akan terjadi reaksi oksidasi reduksi ;

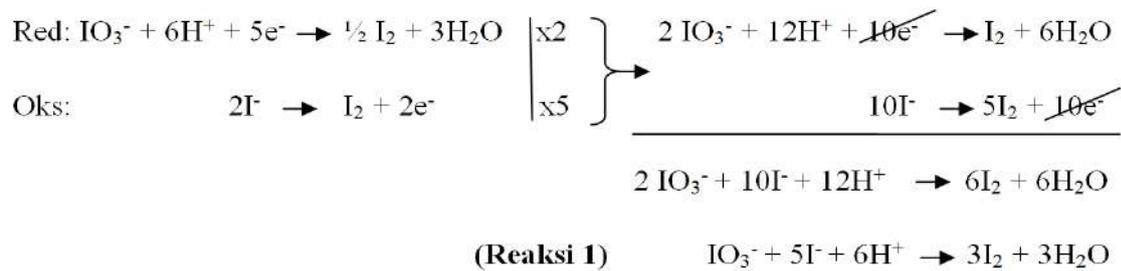
Ion iodat direduksi membentuk iodin



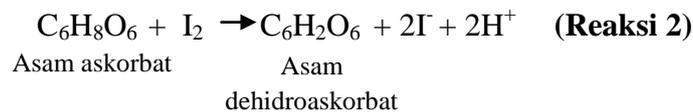
Sedangkan ion iodida dioksidasi membentuk iodine



Reaksi akhir yang terjadi



Iodin (I_2) yang terbentuk pada reaksi ini selanjutnya akan mengoksidasi asam askorbat (vitamin C) membentuk dehidroaskorbat. Sedangkan Iodin akan direduksi menjadi ion iodida sehingga membentuk reaksi sebagai berikut:



Iodin akan tereduksi menjadi ion iodida selama masih terdapat asam askorbat dalam sampel tersebut. Setelah semua asam askorbat teroksidasi menjadi asam dehidroaskorbat, iodin akan bereaksi dengan indikator larutan pati yang ditandai dengan membentuk warna biru-hitam. Terbentuknya warna tersebut menunjukkan titik akhir titrasi (Anonim, n.d.).

Langkah-langkah untuk menentukan kadar vitamin C dalam sampel adalah sebagai berikut :

- a. Menentukan mol IO_3^-

$$\text{Mol } \text{IO}_3^- = \text{Konsentrasi } \text{KIO}_3 \times \text{Rata-rata volume } \text{KIO}_3 \text{ yang dibutuhkan} \\
 \text{hingga titik akhir}$$

- b. Menentukan mol vitamin C

$$\text{Mol vitamin C} = \text{Mol } \text{I}_2 = 3 \times \text{mol } \text{IO}_3^-$$

- c. Menentukan massa vitamin C

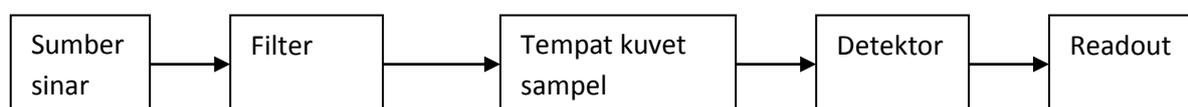
$$\text{Massa vitamin C} = \text{Mol vitamin C} \times \text{Mr Vitamin C}$$

2.8 Spektrofotometer UV-visibel

Spektrofotometer UV-visibel merupakan teknik pengukuran kuantitatif yang berdasarkan pada penyerapan sinar ultraviolet pada daerah panjang gelombang 180-390 nm dan sinar tampak pada daerah panjang gelombang 390-780 nm oleh senyawa kimia dalam fase larutan ataupun gas (Worsfold & Kingdom., 2017). Secara umum senyawa organik menyerap energi pada daerah ultraviolet seperti analit yang akan dianalisa pada penelitian ini yaitu EGCG yang menyerap energi pada panjang gelombang maksimum 273 nm (Shukla *et al.*, 2018).

Nilai Absorbansi (A) dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti absorptivitas molar (ϵ), lebar kuvet (b) dan konsentrasi sampel (c). Hal tersebut dapat dilihat pada persamaan Lamber Beer dibawah ini

$$A = \epsilon \times b \times c \dots\dots\dots(2)$$



Gambar 2. 11 Skema alat spektrofotometer UV-vis

(Worsfold & Kingdom., 2017)

Spektrofotometer UV-vis terdiri dari sumber sinar, pengatur panjang gelombang terpilih, tempat sampel (kuvet), detektor dan pencetak data hasil (readout) seperti pada Gambar 2.11. Pada penelitian ini digunakan jenis spektrofotometer UV-visible Single beam. Single beam tidak dapat mengidentifikasi sampel dan pembanding (referensi) sekaligus. Hal tersebut dikarenakan pada single beam hanya memiliki satu tempat sampel. (Worsfold & Kingdom., 2017).

Tidak semua molekul dapat diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-vis. Hanya molekul yang memiliki gugus kromofor yang dapat diidentifikasi menggunakan

UV-vis. Gugus kromofor merupakan bagian pada molekul yang dapat menyerap energi pada panjang gelombang UV-visibel (Worsfold & Kingdom, 2017). Salah satu kelompok senyawa yang memiliki gugus kromofor yaitu senyawa aromatik seperti EGCG. Pada struktur EGCG (Gambar 2.1) terdiri dari beberapa cincin aromatik. Hal tersebut yang menyebabkan EGCG dapat diidentifikasi menggunakan detektor UV.

2.9 Validasi Metode

Tabel 2. 9 Karakteristik Validasi Metode

Karakteristik Analisis	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Limit test		
Akurasi	Ya	Ya	a	a	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifikasi	Ya	Ya	Ya	a	Ya
Limit Deteksi	Tidak	Tida	Ya	a	Tidak
Limit Kuantifikasi	Tidak	Ya	Tidak	a	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	a	Tidak
Range	Ya	Ya	a	a	Tidak

^a Mungkin diperlukan tergantung tes spesifikasi

Menurut USP 40, Validasi pada suatu proses metode analisis bertujuan untuk memenuhi persyaratan untuk penerapan metode analisis tersebut. Oleh karena itu, validasi merupakan langkah dalam penentuan kepercayaan dan keterulangan metode untuk menjamin metode yang dimaksud dapat diterapkan pada sistem tertentu. USP membagi metode-metode analisis ke dalam beberapa kategori, diantaranya:

1. Kategori I merupakan penentuan kuantitatif komponen utama atau bahan aktif.

2. Kategori II merupakan penentuan pengotor (impurities) atau produk-produk hasil degradasi pada produk akhir farmasetika. Metode ini melingkupi perhitungan kembali secara kuantitatif dan uji batas.
3. Kategori III merupakan penentuan performa karakteristik (contoh: dilusi, pelepasan obat dan lain-lain).
4. Kategori IV uji identifikasi, merupakan uji mengetahui komponen yang ada dalam sampel.

Berdasarkan kategori yang disebutkan di atas, analisis EGCG dalam seduhan teh hijau dengan metode KLT-Densito merupakan jenis metode analisis kategori 1. Berdasarkan Tabel 2.9, karakteristik validasi metode yang harus diuji pada kategori I adalah spesifisitas, linieritas, akurasi dan presisi (USP 40, 2017)

2.9.1 Spesifisitas dan selektifitas

Metode spesifik adalah kemampuan untuk merespon analit tunggal (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Metode Selektif adalah kemampuan yang dapat membedakan analit yang sedang dianalisis dengan komponen lain seperti pengotor, produk hasil degradasi dan senyawa lain (USP 40, 2017)

Metode analisis harus memiliki kemampuan untuk dapat membedakan analit dengan substansi lain yang mirip seperti impurities, isomer, metabolit, produk degradan, komponen endogen dan matrik. Oleh karena itu resolusi (R_s) dari analit dengan komponen lainnya harus lebih dari 1,25. Selain itu nilai R_f standar dan analit pada sampel memiliki nilai yang kurang lebih sama dan harus memenuhi rentang 0,3-0,8 (AOAC International, 2013)

Noda yang terbentuk harus diuji identitas dan selektivitas dengan cara memindai spektra UV/Vis pada panjang gelombang maksimum analit (λ_{\max} EGCG = 278 nm). Untuk

tes identitas spektrum UV/Vis dari puncak noda analit harus dibandingkan dengan spektrum standar referensi yang berada pada satu lempeng yang sama. Untuk determinasi *purity* dari analit diperlukan pengukuran *purity* spektra analit dari titik awal sampai puncak spektra (rsm) dan dari puncak sampai titik akhir spektra (rme). Kemurnian spektra ditandai dengan nilai rsm dan rme lebih besar dari 0,99 (Renger *et al.*, 2011)

2.9.2 Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel pada rentang tertentu. Linieritas mengacu pada hubungan antara konsentrasi analit dan hasil respon (USP 40., 2017). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran pada sampel yang sama dengan 5 konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang didapat selanjutnya diproses untuk menentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien determinasi (Gandjar dan Rohman, 2010).

Kriteria penerimaan linieritas data dilihat pada nilai koefisien determinasi (r^2) \geq 0,995 (FDA., 2014). Selain itu linieritas ini dapat dievaluasi dari beberapa parameter seperti koefisien korelasi (r), *relative process standar deviation value* (V_{xo}), Mandel's test, nilai X_p , residual test dan ANOVA *linierity testing*. Koefisien korelasi (r) dengan persyaratan penerimaan nilai r mendekati 1, *relative process standar deviation value* (V_{xo}) dengan persyaratan penerimaan tidak boleh melebihi 5% dan ANOVA *linierity testing* dengan persyaratan penerimaan $\text{sig} \leq 0,05$.

2.9.3 Akurasi

Akurasi merupakan pendekatan hasil uji yang diperoleh dari prosedur tertentu dengan nilai sebenarnya. Akurasi ditentukan dengan cara menganalisa senyawa standar yang telah diketahui kemurniannya melalui prosedur analisis yang digunakan atau

dibandingkan hasil melalui prosedur analisis yang digunakan dengan hasil prosedur analisis yang telah dinyatakan baik akurasinya. Akurasi dihitung sebagai % recovery yang diukur berdasarkan perbedaan nilai rata-rata uji dengan nilai sebenarnya. ICH menyarankan akurasi diukur pada 3 jenis konsentrasi dengan pengulangan uji sebanyak tiga kali setiap konsentrasi (USP 40, 2017). Kriteria penerimaan rekoverti (Tabel tergantung pada konsentrasi analit pada sampel.

Tabel 2. 10 Persyaratan Rekoverti dan RSD

Konsentrasi analit dalam sampel	Batas rekoverti (%)	Batas RSD (%)
100%	98-101	1,3
>10%	95-102	2,8
>1%	92-105	2,7
>0,1%	90-108	3,7
>0,01%	85-110	5,3
>10 µg/g (ppm)	80-115	7,3
>1 µg/g (ppm)	75-120	11
>10 µg/Kg (ppb)	70-125	21

(AOAC International, 2013)

Rekoverti dapat dihitung dengan rumus dibawah ini

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi terukur}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$

2.9.4 Presisi

Presisi adalah tingkat kesamaan antara hasil uji ketika prosedur analisis diterapkan berulang kali ke beberapa sampel yang homogen atau sama. Presisi dinyatakan dalam % standar deviasi relative atau RSD. ICH merekomendasikan pengulangan uji enam kali pengujian untuk satu konsentrasi (USP 40, 2017). Rumus %RSD dapat dinyatakan:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-x')^2}{(N-1)}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

X merupakan nilai dari masing-masing pengukuran; X' merupakan rata-rata (*mean*) dari pengukuran; N merupakan frekuensi pengukuran. Kriteria penerimaan RSD (Tabel 2.10) terkandung pada konsentrasi analit yang terkandung dalam sampel.