

## Validasi Metode KLT-Densitometri Pada Penetapan Kadar (-)-Epigallocatechin Gallate (EGCG) Dalam Teh Hijau

Chusnul Chatimah<sup>1</sup> Sugijanto<sup>1</sup>. Achmad Toto Poernomo\*

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia

\*Corresponding author E-mail: achmad-t-p@ff.unair.ac.id

### Article History

Received: 12 juli 2020; Received in Revision: 23 Agustush 2020; Accepted: 1 Oktobr 2020

### ABSTRACT

**Background** Tea leaves (*Camellia sinensis* L.) has many health benefits. Green tea leaves contain many polyphenol compounds in high levels, among others, catechin derivatives epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) and epigallocatechin gallate (EGCG). The most dominant bioactive component is EGCG. A simple TLC-Densitometry **methode has been developed for the determination of (-)-Epigallocatechin gallate in green tea product.** **Method** uses silica gel F 254 as a stationer phase and chloroform-acetic acid-formic acid-isopropanol (16:2:2:8) as a mobile phase. Result 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  $Y = 5409,8 X - 569,97$  ( $r = 0,9996$ ;  $V_{x0} = 3,94\%$ ). The methode was validated to determine the imit detection (0,0188 µg), limit quantitation (0,0627µg), accuracy (91,41%), precission for EGCG standart (4,47%) and precission of methode (7,01%). **Conclusion** these results demonstrate that EGCG in green tea products can be detected by TLC-Densitometry method. By using method, EGCG concentration in green tea products is 3,33%.

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

### ABSTRAK

Latar Belakang Daun teh (*Camellia sinensis* L.) memiliki banyak manfaat untuk kesehatan. Daun teh hijau mengandung banyak senyawa polifenol dalam kadar tinggi, antara lain turunan catechin epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC), epicatechin gallate (ECG) dan epigallocatechin gallate (EGCG). Komponen bioaktif yang paling dominan adalah EGCG. Sebuah metode TLC-Densitometry sederhana telah dikembangkan untuk penentuan (-)-Epigallocatechin gallate dalam produk teh hijau. Metode ini menggunakan silika gel F 254 sebagai fase diam dan fase gerak kloroform-asam asetat-asam format-isopropanol (16:2:2:8). Hasil Panjang gelombang maksimum terdeteksi pada 278 nm. Respon linieritas ditemukan (-)-Epigallocatechin gallate antara 0,5043 g–2,5215 g dengan regresi persamaan  $Y = 5409,8 X - 569,97$  ( $r = 0,9996$ ;  $V_{x0} = 3,94\%$ ). Metode divalidasi untuk menentukan deteksi tiruan (0,0188 g), kuantisasi batas (0,0627µg), akurasi (91,41%), presisi untuk standar EGCG (4,47%) dan presisi metode (7,01 %). Kesimpulan hasil ini menunjukkan bahwa EGCG dalam produk teh hijau dapat dideteksi dengan metode TLC-Densitometry. Dengan menggunakan metode, konsentrasi EGCG pada produk teh hijau adalah 3,33%.

Kata kunci : (-)-Epigallocatechin gallate, EGCG, teh, KLT-Densitometri, validasi

## Pendahuluan

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, teophyllin, teobromin, tearubigin, kafein, minyak atsiri dan fluorida. 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 ini akan digunakan dengan metode KLT-Densitometri. Sampai saat ini belum ditemukan validasi penetapan kadar EGCG yang terdapat dalam teh hijau. Disamping itu belum pernah ada 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 populer, lebih mudah dilaksanakan, sederhana dan biaya yang relatif lebih murah daripada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Fried & Sherma, 1994).

Dilihat dari strukturnya, EGCG dalam teh hijau ini bersifat polar dimana memiliki gugus aoksokrom

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 memisahkan 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..

## Material and Methods

**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

### 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

## Validasi Metode Analisis

### Selektifitas

#### 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.

#### 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  $\mu$ L, 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.

### Penentuan Panjang Gelombang Terpilih

Larutan baku 150,6 ppm, ditotolkan pada pelat KLT silika gel F 254 sebanyak 10 $\mu$ L, 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.

### 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 ( $\pm$  80-900C) 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  $\mu$ L, dieluasi dengan fase gerak terpilih, kemudian noda yang diperoleh diamati menggunakan Densitometer (Shirai et al., 1994).

### Penentuan Faktor Retardasi (Rf), Faktor Selektifitas ( $\alpha$ ) dan Derajat Keterpisahan/Resolusi (Rs)

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

$$R_f = \frac{\text{jarak migrasi komponen}}{\text{jarak migrasi fase gerak}}$$

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

$$\alpha = \frac{t_{RB}}{t_{RA}}$$

$\alpha$  = Dimana:

$\alpha$  = 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.

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_1 + W_2}$$

Dimana:

tRA = Jarak yang ditempuh oleh analit A

tRB = 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).

### 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  $\mu$ L kemudian dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang telah jenuh oleh uap fase gerak terpilih dan

dieuasi. Noda yang dihasilkan diukur areanya dengan Densitometer. Kemudian didapatkan area, setelah itu dibuat kurva jumlah EGCG ( $\mu\text{g}$ ) terhadap area EGCG. Dapat dihitung persamaan regresinya  $y = bX + a$ , koefisien korelasi ( $r$ ) dan koefisien variasi fungsi ( $V_{xo}$ ).

#### 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, dieuasi dengan fase gerak terpilih. Untuk menghitung harga  $S_b$ , diperoleh dengan menotolkan metanol sebagai blanko, kemudian dieuasi bersama delapan macam konsentrasi tersebut, selanjutnya analisis dengan Densitometer, kemudian diperoleh area puncak pengotor tertinggi ( $N_p$ ) dan area puncak pengotor terendah ( $p$ ), sehingga  $S_b = N_p - p/5$ .

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

$$C = K \frac{S_b}{S_l}$$

Dimana: C = konsentrasi pada BD dan BK  
 $S_b$  = standar deviasi serapan blanko  
 $S_l$  = sensitivitas slop  
 K = konstanta, untuk BD = 3 dan BK = 10

#### 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 ( $\pm 80^\circ\text{C}$ ) 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  $\mu\text{L}$  dan menotolkan juga 5 macam konsentrasi linieritas untuk persamaan regresinya. Dari masing-masing larutan dieuasi 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 (% rekovery).

$$\% \text{ rekovery} = \frac{\text{banyaknyaEGCG total} - \text{banyaknyaEGCG sampel}}{\text{banyaknyaEGCG yang ditambahkan}} \times 100\%$$

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

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

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

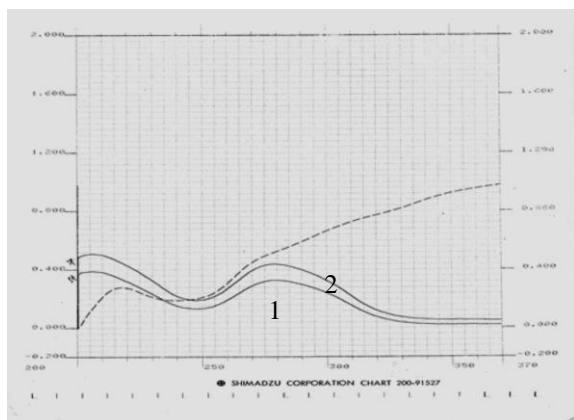
#### Penetapan Kadar EGCG dalam Produk Teh Hijau

Ditimbang teliti sampel produk teh hijau sebanyak 0,0800 g dengan neraca analitik, dimasukkan dalam 10 ml air panas ( $\pm 80-90^\circ\text{C}$ ) 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  $\mu$ L, 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.

#### Penentuan Panjang Gelombang Terpilih

Hasil pengamatan penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum EGCG pada standar dan sampel teh hijau pada rentang panjang gelombang ( $\lambda$ ) 200-370 nm adalah sebagai berikut gambar 1:



Gambar 1 Spektrum Absorban-Reflektan standar EGCG dan sampel teh hijau yang telah diekstraksi dengan pengukuran menggunakan Densitometer CS 930.

(Keterangan : Standar EGCG kadar 150,6 ppm; 2 : 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.

#### 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  $\mu$ L, 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 1** dan gambar 2

**Tabel 1** Hasil pengamatan linieritas EGCG

Konsentrasi EGCG (ppm)	Jumlah EGCG ( $\mu$ g)	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

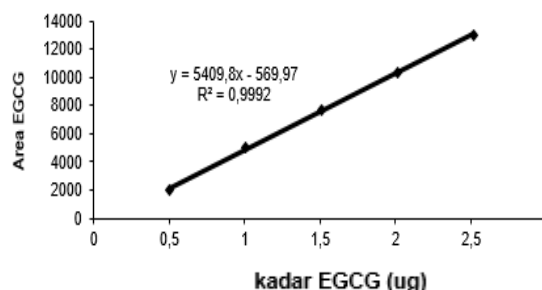
Persamaan garis regresi

$$Y = 5409,8 X - 569,97$$

$$r_{\text{hitung}} = 0,9996; r_{\text{tabel}} (\alpha=0,05) = 0,811$$

$$\text{Koefisien variasi fungsi (Vxo)} = 3,94\%$$

Harga  $r_{\text{hitung}} > r_{\text{tabel}}$ ,  $V_{xo} < 5\%$  sehingga ada hubungan yang linier antara konsentrasi EGCG terhadap area EGCG.



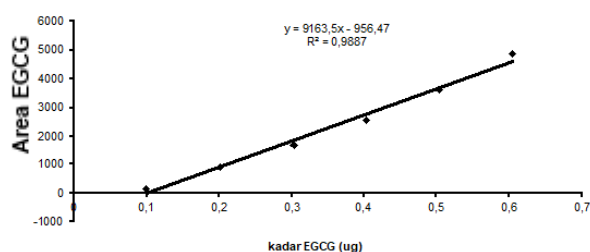
Gambar 2 Kurva Hubungan antara banyaknya EGCG ( $\mu$ g) terhadap Area EGCG untuk Linieritas.

#### 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  $\mu$ L pada pelat KLT silika gel F 254, dieluasi dengan fase gerak terpilih. Untuk menghitung harga  $S_b$ , diperoleh dengan menotolkan metanol sebagai blanko, dieluasi bersama delapan macam konsentrasi tersebut, Noda yang diperoleh diamati dengan Densitometer. kemudian diperoleh area puncak pengotor tertinggi ( $N_p$ ) dan area puncak pengotor terendah (p), sehingga  $S_b = N_p - p/5$ . Hasil penentuan ini dapat dilihat pada **tabel 2** dan gambar 3

**Table 2** Hasil penentuan BD dan BK untuk EGCG

Konsentrasi EGCG (ppm)	Jumlah EGCG ( $\mu\text{g}$ )	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 3 Kurva Hubungan antara banyaknya EGCG ( $\mu\text{g}$ ) terhadap area EGCG untuk Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.

$Y = 9163,3X - 956,41$ ;  $r_{\text{hitung}} = 0,9943$ ;  $r_{\text{tabel}} (\alpha=0,01) = 0,754$

### 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**.

**Table 3.** Hasil Penentuan Presisi Standar EGCG

Kadar	Jumlah ( $\mu\text{g}$ )	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 = 11742,170

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).

### 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  $\mu\text{L}$  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 4**, **tabel 5**.

**Table 4** Hasil Penentuan Linieritas untuk Akurasi

Konsentrasi (ppm)	Jumlah EGCG ( $\mu\text{g}$ )	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  $Y = 7053,2 X - 1560,9$

$r_{\text{hitung}} = 0,9964$ ;  $r_{\text{tabel}} (\alpha=0,05) = 0,811$

**Table 5** Hasil Penentuan Akurasi dan Presisi Metode dalam sampel produk Teh Hijau.

Replikasi	Area Sp+std	Banyaknya EGCG total (Sp+Std EGCG) ( $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ )	Banyaknya EGCG dalam Sampel ( $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ )	Std (EGCG) yang ditambahkan ( $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ )	% 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
$\bar{x} = 91,41\%$ SD = 6,404 KV = 7,01%					

Keterangan (\*); data ditolak karena diluar rentang  $\bar{x} \pm 2,5 \text{ SD}$  (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).

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.

### 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 6

Tabel 6 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 =  $3,33 \pm 0,08\%$ .

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 0,1625 dan fase gerak kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) diperoleh harga Rf antara sampel dan standar 0,21,  $R_s = 2$  dan  $\alpha = 1,35$ . Harga Rf yang memenuhi persyaratan Rf optimum yaitu 0,2-0,8,  $R_s > 1,5$  dan  $\alpha > 1$  (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.

Berdasarkan 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 (0,8111) dan  $V_{x0} = 3,94\%$ , yang mana syarat  $V_{x0}$  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.

Penentuan harga batas deteksi (BD) dan batas kuantitasi (BK) yang dibuat dengan 5 macam konsentrasi, didapat persamaan regresi  $Y = 9163,3X - 956,41$ ;  $r = 0,9943$ ; ( $\alpha = 0,01$ ;  $n = 4$ ) yaitu 0,754. 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 rekovery 91,41% dimana persyaratan akurasi untuk sampel biologis mempunyai rentang % rekovery antara 80-120% (Carr & Wahlich, 1990) sehingga % rekovery memenuhi persyaratan.

Penentuan 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 (Curniff, 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 ( $3,33 \pm 0,08$ ) %.

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa : Fase gerak terpilih untuk penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau adalah kloroform-asam asetat-asam formiat-isopropanol (16:2:2:8) dengan harga  $R_f = 0,21$  ;  $R_s = 2$  dan  $\alpha = 1,35$ .

Penetapan kadar EGCG dalam produk teh hijau dengan menggunakan metode KLT-Densitometri memenuhi persyaratan validasi metode.

Kadar rata-rata EGCG dalam produk teh hijau adalah ( $3,33 \pm 0,08$ )%.

### Daftar Pustaka

Amarowicz, R., Shahidi, F., Wiczowski, 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**, 14<sup>th</sup> Edition, Pennsylvania, Mack Publishing Company. Pp. 1578.

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

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

Fried, B. and Sherma, J., 1994. **Thin Layer Chromatography, Techniques and**

**Applications**. 3<sup>rd</sup> edition, revised and expanded, New York : Marcel Dekker, Inc.

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

Fessenden, R, J., and Fessenden, J, S., 1986. **Kimia Organik**. Terjemahan. Edisi 3, PT. Gelora Aksara Pratama. hal. 446-448.

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., 2003. **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 Applications**: Marcel Dekker, Inc. pp 17-23

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

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

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

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

Patricia Curniff, 1995, Official Methods of Analysis of AOAC International, 16<sup>th</sup> 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 aanalysis 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 Coupled 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*).