

Optimasi Prosedur Ekstraksi Produk Teh Hitam Untuk Penetapan Kadar EGCG Menggunakan Metode KCKT

Imam Tri SUSILO¹⁾, Asri DARMAWATI^{1*)}, Djoko Agus PURWANTO¹⁾

¹⁾Fakulta Farmasi Universitas Airlangga

^{*)} Corresponding Author, Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286, e-mail : asridarmawati@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan membandingkan dua prosedur preparasi sampel produk teh hitam untuk meningkatkan validitas penentuan kadar EGCG menggunakan KCKT. Dua prosedur tersebut diawali dengan pemisahan EGCG dari matrik sampel menggunakan kloroform. Pada Prosedur A, EGCG dalam fraksi air diekstraksi menggunakan etil asetat sebelum disuntikkan ke dalam KCKT. Sedangkan pada Prosedur B, EGCG dalam fraksi air langsung disuntikkan ke dalam KCKT. Kondisi operasional KCKT yang optimal adalah sebagai berikut: kolom KCKT yang digunakan adalah RP C-18 3,9x300mm dengan fase diam μ Bondapak 10 μ m dan detektor PDA. Fase gerak adalah campuran metanol:air:asam asetat 2% dengan perbandingan 35:60:5. Laju alir 0.45 ml/menit, suhu kolom 30 oC dan puncak analit dideteksi pada panjang gelombang 276 nm. Hasil validasi metode menunjukkan waktu retensi EGCG adalah 10,9 menit. Prosedur A selektif untuk EGCG, karena dapat memisahkan puncak EGCG dari puncak analit sebelum dan sesudah EGCG dengan resolusi masing-masing 2,11 dan 2,39. Perolehan kembali EGCG dengan prosedur A adalah 88,32% dengan KV 10,94%. Prosedur B dapat memisahkan puncak EGCG dari puncak analit sebelum dan sesudah EGCG dengan resolusi masing-masing 0,53 dan 1,37. Perolehan kembali EGCG dengan prosedur B adalah 96,04% dengan KV 3,68%. Hasil uji statistik menggunakan SPSS menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antara perolehan kembali EGCG dengan Prosedur A dan Prosedur B. Sebagai kesimpulan, Prosedur B memberikan persen perolehan kembali EGCG lebih besar dibanding Prosedur A..

Kata kunci: KCKT, Prosedur ekstraksi, teh hitam, EGCG.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare between two preparation procedures for EGCG extraction from black tea product to increase the validity of EGCG determination using HPLC. Those two procedures were done after matrix sample extraction using chloroform. In the first procedure (Procedure A), EGCG in aqueous fraction was extracted using ethyl acetate prior to injected in HPLC. While another procedure (Procedure B), EGCG in aqueous fraction was directly injected in the HPLC. Optimum operational HPLC conditions were as follow: column used was RP-HPLC C-18 of 3.9x300mm with μ Bondapak 10 μ m as stationary phase and PDA detector. The Mobile phase was a mixture of methanol:water:2% acetic acid (35:60:5) with flow rate of 0,45 ml/minute. Column temperature was set at 30°C and peak detection at the wavelength of 276 nm. The method validation obtained that extraction using Procedure A was selective for EGCG. Resolution among EGCG peak with the nearest peaks that eluted before and after EGCG peak were 2.11 and 2.39, respectively. The EGCG recovery was 88.32% with coefficient of variation (CV) of 10.94%. While the extraction using Procedure B showed that EGCG peak was separated from the nearest peaks with Rs of 0.53 and 1.37 respectively. The EGCG recovery using the extraction Procedure B was 96.04% with CV of 3.68%. The retention time of EGCG was 10.9 minute. The SPSS program showed that there was a significant difference between EGCG recoveries after extraction using Procedure A and Procedure B, respectively. In conclusion extraction procedure B showed a better EGCG recovery.

Keywords: HPLC, extraction procedure, black tea extract, EGCG.

PENDAHULUAN

Teh berasal dari tanaman *Camellia sinensis* yang awalnya digunakan sebagai obat dan kemudian berkembang menjadi minuman untuk konsumsi manusia (Juneja et al., 2013). Diantara beberapa komponen teh yang mampu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan jaringan oleh radikal bebas adalah epigallocatekin galat (EGCG), suatu senyawa turunan polifenol (Winarsi, 2005). Sifat antioksidan dari EGCG ini dapat mencegah terjadinya penyakit kardiovaskular, mencegah kerusakan sel β pankreas yang disebabkan oleh radikal bebas dan memiliki efek protektif pada ginjal

(Htay et al., 2013); (Sakuma et al., 2013); (Yokozawa et al., 2013).

Berdasarkan proses pembuatannya, teh diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu teh yang tidak difermentasi (teh hijau), teh yang mengalami semifermentasi (teh oolong), dan teh yang difermentasi (teh hitam) (Li and Zhu, 2016). Perbedaan proses fermentasi teh dapat menyebabkan kandungan EGCG dalam teh berbeda. Selain itu faktor genetik tanaman, kondisi lingkungan penanaman, waktu panen, perlakuan setelah panen dan penyimpanan dapat menyebabkan perbedaan kandungan tanaman teh.

Metode penentuan kadar EGCG dalam sampel teh yang umum digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Beberapa senyawa lain dalam matrik sampel dapat menimbulkan masalah pada penentuan kadar EGCG dengan metode KCKT. Gangguan tersebut antara lain menyebabkan kolom cepat buntu dan puncak EGCG tidak terpisah sempurna dari senyawa lain dalam matrik sampel. Hal ini menyebabkan hasil penetapan kadar EGCG tidak akurat. Oleh karena itu, sebelum disuntikkan ke dalam instrumen, perlu dilakukan proses ekstraksi matrik sampel agar penentuan kadar EGCG akurat (Moldoveanu and David, 2015).

Berdasarkan penelitian Row & Jin, 2003, ekstraksi seduhan teh menggunakan kloroform dapat memisahkan EGCG, EGC (epigallo katekin), ECG (epikatekin galat), dan epi katekin (EC) dari matriknya. Bila dilanjutkan dengan mengekstraksi fraksi air menggunakan etil asetat maka sebagian besar EGCG akan terekstraksi ke dalam fraksi etil asetat. Fase etil asetat inilah yang kemudian dianalisis dengan KCKT. Namun penelitian tersebut ditujukan untuk analisis kualitatif, sedangkan belum pernah dilaporkan hasil validasi cara ekstraksi ini untuk analisis kuantitatif EGCG.

Proses ekstraksi EGCG tersebut di atas terlalu panjang dan dapat menyebabkan sebagian EGCG terbuang. Berkurangnya EGCG selama proses ekstraksi berakibat pada menurunnya nilai perolehan kembali analit. Sehingga pada penelitian ini validitas metode penentuan kadar EGCG dengan Prosedur preparasi sampel tersebut diatas (Prosedur A) akan dibandingkan dengan validitas Prosedur B yang merupakan pemotongan Prosedur A yaitu fraksi air yang mengandung EGCG langsung disuntikkan ke dalam KCKT, tanpa didahului dengan ekstraksi menggunakan etil asetat.

METODE PENELITIAN

Alat

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Agilent 1100 series low pressure gradient), kolom RP C-18 μ Bondapak 10 μ m, 3,9 x 300mm, detektor Photodiode Array, Neraca analitik dengan kepekaan 0,1 mg, Corong pisah dan alat gelas yang lain.

Bahan

Sampel produk teh hitam, EGCG standar (Xián Rhongseng Co Ltd, kemurnian > 98%), Nylon membran filter 0,2 μ m (Whatmann), metanol pro KCKT (Merck), asam asetat p.a (Merck), kloroform p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), Aqua pro injectione (PT. Ikapharmindo Putramas), Air suling.

Prosedur Kerja

Prosedur ekstraksi A

Ditimbang 2,0 gram serbuk sampel teh hitam kemudian diseduh dengan 80 ml air suhu 100°C dalam gelas piala, diaduk, lalu didiamkan 30 menit. Selanjutnya, seduhan teh disaring menggunakan kertas saring dan filtrat ditampung dalam labu ukur 100,0 ml. Selanjutnya kertas saring dibilas dengan air suling dan

filtrat yang diperoleh ditambahkan ke dalam labu ukur. Akhirnya labu ukur ditambah dengan air suling hingga tepat tanda dan dikocok homogen. Larutan teh hitam tersebut dipipet 10,0 ml dan diekstraksi menggunakan 3x10 ml kloroform dalam corong pisah (*). Fraksi kloroform dibuang dan fraksi air diekstraksi lagi dengan 3x10 ml etil asetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan dan diuapkan dalam lemari asam sampai kering. Residu penguapan dilarutkan dalam 10,0 ml metanol:air (50:50). Sampel teh yang telah melalui proses preparasi, disaring dengan kertas saring Whatman 0,2 μ m dan selanjutnya diinjeksikan ke dalam KCKT (Row and Jin, 2003).

Prosedur ekstraksi B

Dilakukan prosedur ekstraksi sama dengan prosedur ekstraksi A sampai tahap (*). Setelah fraksi kloroform dibuang, dipipet 5,0 ml fase air untuk dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Selanjutnya ditambahkan metanol ke dalam labu ukur tersebut hingga tepat tanda. Larutan yang diperoleh disaring dengan kertas saring Whatmann 0,2 μ m sebelum diinjeksikan ke dalam instrumen.

Pembuatan larutan induk EGCG standar

Ditimbang 10,0 mg EGCG standar untuk dilarutkan dalam campuran metanol: air (50:50) di labu takar 10,0 ml. Diperoleh larutan standar EGCG 1000 ppm.

Pembuatan fase gerak

Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran metanol, air dan asam asetat 2%. Masing-masing pelarut di saring dengan kertas Whatman pori 0,2 μ m dan dibebaskan gas sebelum digunakan.

Optimasi kondisi operasional KCKT

Diatur komposisi fase gerak, laju alir fase gerak dan suhu kolom agar puncak analit (EGCG) terpisah dari analit lain dalam sampel. Panjang gelombang detektor dipilih sesuai panjang gelombang maksimum EGCG standar.

Validasi metode KCKT

Parameter validasi yang ditentukan meliputi selektifitas, linearitas, akurasi dan presisi (ICH, 1995); (USP 37, 2014).

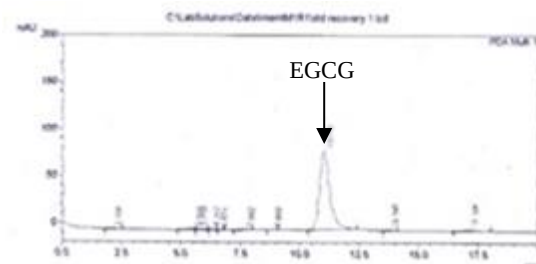
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi kondisi KCKT

Optimasi kondisi KCKT dilakukan untuk mendapatkan profil kromatogram dari ekstrak sampel teh hitam ketika puncak area EGCG terpisah dari puncak area analit lain yang muncul sebelum dan sesudah puncak EGCG. Hasil optimasi KCKT tercantum pada Tabel 1. Dengan menggunakan kondisi optimum ini diperoleh kromatogram EGCG standar (Gambar 1). Kromatogram sampel dan sampel yang diadisi EGCG standar, masing-masing untuk sampel yang di preparasi dengan Prosedur A (Gambar 2,3) maupun Prosedur B (Gambar 4) tercantum sebagai berikut.

Tabel 1. Hasil Optimasi Kondisi KCKT untuk Analisis EGCG dalam Teh Hitam.

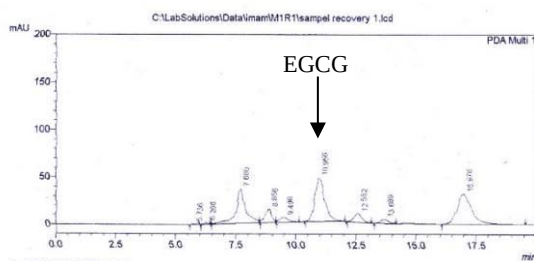
Parameter	Kondisi
Fase Gerak	Metanol : air : asam asetat 2% (35 : 60 : 5)
Laju alir Fase Gerak	0,45 ml/menit
Suhu	30° C
Panjang Gelombang	276,0 nm



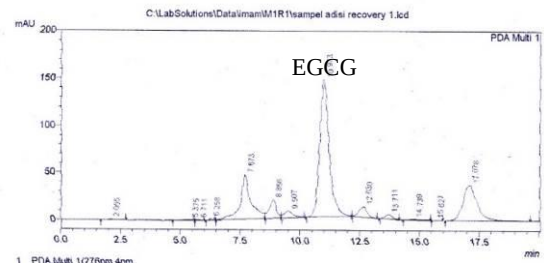
Gambar 1. Kromatogram EGCG standar menggunakan fase gerak metanol:air:asam asetat 2% (35:60:5 v/v/v)

Berdasarkan profil kromatogram sampel teh hitam, resolusi (R_s) puncak area EGCG dengan puncak-puncak sebelum dan sesudah EGCG adalah 2,11 dan 2,39. Resolusi $\geq 1,5$ menunjukkan keterpisahan yang baik antar puncak (ICH,1995)(Yuwono dan Indrayanto, 2005). Waktu retensi EGCG pada tiga sampel tersebut sama yaitu pada menit ke 10,9. Puncak area EGCG pada sampel yang diadisi EGCG standar memiliki profil yang identik, analisis peak purity menunjukkan hasil similarity index sebesar 0,999740, hal ini menunjukkan bahwa puncak EGCG tidak terkontaminasi senyawa lain dalam sampel (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

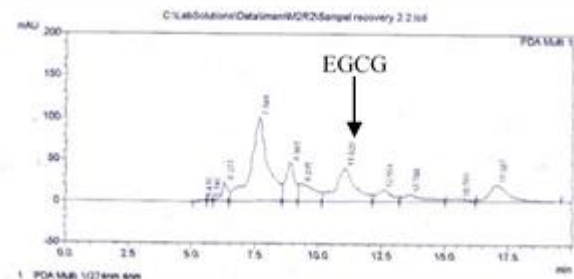
Kromatogram EGCG hasil preparasi sampel dengan prosedur ekstraksi A



Gambar 2. Kromatogram sampel teh hitam (dengan prosedur ekstraksi A) dan dielusi menggunakan fase gerak metanol:air:asam asetat 2% (35:60:5 v/v/v)

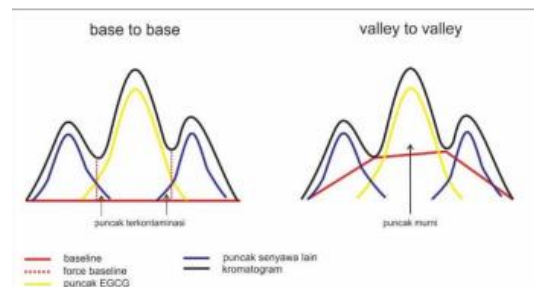


Gambar 3. Kromatogram sampel teh hitam (dengan prosedur ekstraksi A) yang diadisi dengan EGCG standar dan dielusi menggunakan fase gerak metanol:air:asam asetat 2% (35:60:5 v/v/v)



Gambar 4. Kromatogram sampel teh hitam (dengan prosedur ekstraksi B) dielusi menggunakan fase gerak metanol:air:asam asetat 2% (35:60:5 v/v/v)

Resolusi dari puncak EGCG dengan puncak-puncak sebelum dan sesudah EGCG adalah 0,53 dan 1,37. Resolusi kurang dari 1,5 menunjukkan puncak area EGCG tidak terpisah sempurna dari puncak area analit sebelum dan sesudah EGCG. Oleh karena itu untuk analisis kuantitatif, integrasi area puncak EGCG didasarkan pada pengukuran pembacaan area dari Valley to Valley. Bila integrasi area EGCG yang tidak terpisah sempurna didasarkan pada pengukuran dari Base to Base maka akan menyebabkan kesalahan, sebab area puncak EGCG terkontaminasi dengan sebagian area senyawa lain didekatnya sehingga hasil integrasi area puncak EGCG tidak akurat (Gambar 5).



Gambar 5. Integrasi puncak kromatogram dengan pengaturan *base to base* dan *valley to valley*

Linearitas

Hasil pengukuran area puncak EGCG standar pada berbagai konsentrasi ditampilkan pada Tabel 2

Tabel 2. Area puncak EGCG pada berbagai konsentrasi

X Konsentrasi EGCG (ppm)	Y Area Puncak (Au)
20,08	910607
40,16	1956720
60,24	2839760
80,32	4065075
100,40	5072413

Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali dilakukan dengan cara adisi EGCG standar yang ditambahkan ke dalam sampel teh hitam. Selanjutnya dipreparasi dengan prosedur ekstraksi A maupun prosedur ekstraksi B.

Data perolehan kembali EGCG dengan prosedur ekstraksi A dapat dilihat pada Tabel 3. Data perolehan kembali EGCG dengan prosedur ekstraksi B dapat dilihat pada Tabel 4.

Persen perolehan kembali kedua prosedur ekstraksi ini kemudian dianalisis dengan SPSS one sampel t test dengan tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dari kedua prosedur ekstraksi.

Tabel 3. Perolehan kembali EGCG standar dengan prosedur ekstraksi A

Replikasi	Kadar EGCG dalam larutan sampel (ppm)	Kadar EGCG standar diadisi (ppm)	Perolehan kembali EGCG standar (ppm)	Perolehan Kembali EGCG standar (%)
1	28,79	64,51	51,50	79,83
2	40,76	63,87	66,13	103,54
3	37,56	64,51	55,49	86,02
4	53,19	64,13	58,58	91,34
5	44,48	63,87	51,67	80,89
			X	88,32
			SD	9,66
			KV	10,94%

Tabel 4. Perolehan kembali EGCG standar dengan prosedur ekstraksi B

Replikasi	Kadar EGCG dalam larutan sampel (ppm)	Kadar EGCG standar diadisi (ppm)	Perolehan kembali EGCG standar (ppm)	Perolehan Kembali EGCG standar (%)
1	22,47	39,92	39,50	98,95
2	21,30	39,92	39,05	97,82
3	20,36	40,08	36,05	89,94
4	24,88	40,08	38,72	96,61
5	25,54	40,08	38,82	96,86
			X	96,04
			SD	3,53
			KV	3,68 %

Berdasarkan hasil perhitungan, didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($<0,05$) yang artinya ada perbedaan bermakna dari dua prosedur ekstraksi. Prosedur ekstraksi B memiliki nilai rata-rata perolehan kembali yang lebih baik dibanding prosedur ekstraksi A. Namun, ekstraksi menggunakan prosedur ekstraksi B menunjukkan area dari EGCG tidak terpisah dengan area sebelum dan sesudah EGCG dalam sampel teh hitam.

Berdasarkan hasil penelitian ini diperoleh rata-rata nilai perolehan kembali dari prosedur ekstraksi A 88,32% dengan koefisien variasi 10,94% sedangkan rata-rata perolehan kembali dengan prosedur ekstraksi B adalah 96,04% dengan koefisien variasi 3,68%. Prosedur ekstraksi A memiliki nilai perolehan kembali yang lebih rendah dibandingkan dengan prosedur ekstraksi B. Nilai perolehan kembali yang rendah ini dapat disebabkan oleh beberapa hal antara lain proses ekstraksi yang terlalu panjang yang mengakibatkan sebagian EGCG terbuang dalam proses. Demikian juga lama waktu pengeringan sampel (5-6) jam dapat mempengaruhi variasi nilai perolehan kembali karena EGCG dapat teroksidasi oleh udara.

KESIMPULAN

Berdasarkan data nilai akurasi dan presisi, ekstraksi EGCG dengan Prosedur B memiliki nilai akurasi dan presisi yang lebih baik dari Prosedur A. Namun resolusi EGCG dengan analit yang terelusi sebelum dan sesudah EGCG dalam sampel teh hitam yang diekstraksi menggunakan Prosedur B belum memenuhi persyaratan. Untuk itu perlu dilakukan optimasi lebih lanjut untuk prosedur B dalam penelitian berikutnya. Optimasi dapat dilakukan dengan mengganti komposisi fase gerak secara gradien, menggunakan kolom dengan ukuran partikel yang lebih kecil atau menggunakan kolom coupling untuk memperoleh keterpisahan yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Htay, H. H., Kapoor, M. P., Rao, T. P., Okubo, T., & Juneja, L. R. (2013). Green Tea Polyphenols in Cardiovascular Diseases. Green Tea Polyphenols: Nutraceuticals of Modern Life, 139.
- International Council for Harmonisation. (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. European Medicines Agency, (pp. 1-15). London.
- Juneja, L. R., Kapoor, M. P., Okubo, T., & Rao, T. (2013). Green tea polyphenols: nutraceuticals of modern life. CRC Press.
- Li, X., Zhu, X. (2016). Tea: Types, Production, and Trade. Encyclopedia of Food and Health, 279-282.
- Moldoveanu, S. C., and David, V. (2014). Modern sample preparation for chromatography. Elsevier.
- Row, K. H., & Jin, Y. (2006). Recovery of catechin compounds from Korean tea by solvent extraction. Bioresource technology, 97(5), 790-793.

- Sakuma, T. Takase, H. Hase, T. & Tokimitsu, I. (2013). Green Tea Polyphenol in Weight Management (Obesity) and Diabetes. Green Tea Polyphenols: nutraceuticals of modern life. CRC Press.
- United State Pharmacopoeia 37th edition, 2014. Validation of Compendial Procedures 1225. s.l.:United State Pharmacopoeial Inc.
- Winarsi, H. (2005). Antioksidan Alami dan Radikal. Kanisius.
- Yokozawa, T. Noh, J.S. Park, C. H. & Park, J.C. (2013). Green Tea Polyphenols for the Protection of Internal Organs-Focus on Renal Damage Caused by Oxidative Stress. Green Tea Polyphenols: nutraceuticals of modern life. CRC Press.
- Yuwono, M., & Indrayanto, G. (2005). Validation of chromatographic methods of analysis. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, 32, 243-259.