

ANALISIS KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI UNTUK PENETAPAN KADAR ASAM GALAT, KAFEIN DAN EPIGALOKATEKIN GALAT PADA BEBERAPA PRODUK TEH CELUP

High Performance Liquid Chromatography Analysis for Determination of Gallic Acid, Caffeine, and Epigallocatechin Gallate Concentration in Various Tea Bags Product

Yohanes Martono¹, Sudibyo Martono²

¹Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, Gedung Y Jalan Diponegoro 52-60, Salatiga 50733

²Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

ABSTRAK

Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang cepat dan akurat untuk penetapan kadar asam galat, kafein dan epigalokatekin galat (EGCG) dengan sistem elusi fase gerak secara isokratik telah dikembangkan. Sistem KCKT terdiri atas kolom fase terbalik C18 (Eurosphere C18, 250 × 4,6 mm i.d., 5µm), fase gerak campuran asam *ortho*-fosfat 0,1% : air : asetonitril : metanol (14 : 7 : 3 : 1 v/v/v/v) pH = 4,00 dengan kecepatan alir 1,2 mL/min serta dideteksi pada UV 280 nm. Validasi metode ini dikonfirmasi terhadap selektivitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi. Metode yang dikembangkan dapat memenuhi syarat-syarat validasi metode dan telah digunakan untuk menganalisis berbagai produk teh celup (teh hijau dan hitam). Pada teh hijau, hasilnya menunjukkan bahwa kandungan terbesar adalah EGCG diikuti kafein dan asam galat sedangkan pada teh hitam, EGCG tidak terkuantitasi.

Kata kunci: KCKT isokratik, asam galat, kafein, epigalokatekin galat

ABSTRACT

A rapid and accurate High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method for determination of gallic acid, caffeine, and epigallocatechin gallate (EGCG) with an isocratic mobile phase elution was developed. HPLC parameters consisted of a C18 reversed-phase column (Eurosphere C18, 250 × 4.6 mm i.d., 5µm), mobile phase composed of 0.1% *ortho* phosphoric acid : water : acetonitrile : methanol (14 : 7 : 3 : 1 v/v/v/v) pH = 4.00, flow rate 1.2 mL/min and was detected by UV detector at 280 nm. The validation of this method was confirmed from selectivity, linearity, accuracy and precision, limit of detection and limit of quantification. The method developed has proved to comply with validation requirements and has been applied to analyze various tea bag products (green and black tea). In green tea, the results showed that the highest amount of constituent was EGCG followed by caffeine and gallic acid, whereas in black tea, EGCG can not be measured.

Keywords: HPLC isocratic, gallic acid, caffeine, epigallocatechin gallate

PENDAHULUAN

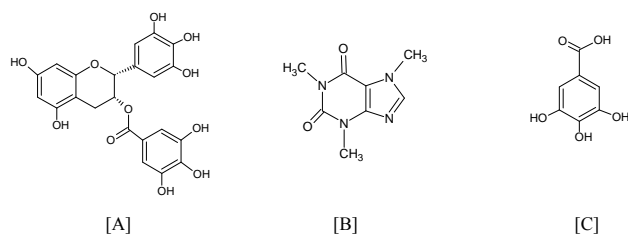
Teh adalah salah satu jenis minuman yang paling dikenal di dunia. Indonesia termasuk dalam 5 negara terbesar pengekspor teh selain India, China, Sri Lanka, dan Kenya. Produksi ekspor teh di Indonesia mencapai 6% dari total ekspor teh dunia (Anonim, 2008). Di dalam negeri,

teh dikonsumsi dalam bentuk minuman. Berbagai produk teh telah dikembangkan, dan salah satu produk teh yang dikembangkan secara luas adalah teh celup. Sediaan teh jenis ini digemari masyarakat karena praktis penyiapannya.

Berbagai penelitian selama dasawarsa terakhir abad 20 ini menunjukkan bukti bahwa teh dapat menjaga kesehatan tubuh manusia. Hasil studi epidemologik menunjukkan

bahwa teh dan flavonoid turunan teh dapat menurunkan risiko penyakit kardiovaskuler dan arterosklerosis (Miura dkk., 2001). Teh juga dapat digunakan sebagai agen pencegah kanker dan hasil penelitian menunjukkan bahwa teh hijau dapat menghambat pertumbuhan sel kanker kolorektal (prostaglandin E2) (August dkk., 1999).

Berbagai efek menyehatkan dari teh tersebut disebabkan karena kandungan senyawa fitokimia dalam teh. Senyawa fitokimia yang banyak terkandung di dalam teh adalah katekin. Senyawa turunan katekin terbesar yang terkandung dalam teh adalah epigalokatekin galat (EGCG), yaitu 60-70% dari total katekin (Svobodova dkk., 2003). Selain katekin, teh juga mengandung senyawa polifenol lain yaitu asam galat dan juga mengandung kafein. Kandungan senyawa fitokimia tersebut berbeda baik dari segi jenis, komposisi dan kadarnya antara teh hijau dan teh hitam (Zhen, 2002). Struktur kimia EGCG, kafein, dan asam galat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur kimia berbagai senyawa fitokimia dalam teh. [A] epigalokatekin galat, [B] kafein, [C] asam galat

Berbagai metode penetapan kadar senyawa turunan katekin dalam teh telah dikembangkan, yaitu senyawa katekin, epikatekin, galokatekin galat, epikatekin galat, dan epigalokatekin galat. Sedangkan senyawa fitokimia lain yang juga ditetapkan kadarnya adalah kafein dan asam galat (Murakami dkk., 2006; Cabrera dkk., 2003; Gafner dkk., 1999; Saito dkk., 2006; Prayong dkk., 2007; Li He dkk., 2007). Metode yang dikembangkan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) baik untuk sistem elusi gradien maupun isokratik. Berbagai pelarut fase gerak yang digunakan diantaranya air, asetonitril, metanol, etilasetat, asam asetat, dan asam orto-fosfat. Sedangkan fase diam pada umumnya menggunakan RP C-18 dengan panjang kolom bervariasi antara 12,5 cm dan 25,0 cm (Saito dkk., 2006; Prayong dkk., 2007; Li He dkk., 2007). Dari metode yang telah dikembangkan ternyata tidak semua telah dilakukan validasi metode dan memberikan profil kromatogram yang diharapkan. Metode yang dikembangkan Prayong dkk. (2007) belum memiliki profil kromatogram yang diharapkan (belum ada jaminan nilai plat teori, N), sedangkan metode yang dikembangkan Saito dkk. (2006) sudah memiliki nilai $N > 2000$ namun belum dilakukan validasi metode.

Pada metode yang telah dikembangkan sebelumnya, hampir semuanya melakukan preparasi sampel dengan ekstraksi pelarut. Mengingat bahwa sifat senyawa yang akan dianalisis adalah polar, maka pelarut yang digunakan adalah metanol, atau etanol, ataupun fase geraknya (Saito dkk., 2006; Prayong dkk., 2007; Li He dkk., 2007). Sedangkan detektor UV digunakan karena senyawa aktif yang akan dianalisis yaitu asam galat, kafein dan epigalokatekin galat menyerap radiasi elektromagnetik pada daerah UV, yaitu pada panjang gelombang 210 dan 280 nm (Saito dkk., 2006). Penggunaan detektor ini juga sangat luas dan banyak digunakan di laboratorium analisis pada umumnya.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mendapatkan metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan sistem elusi fase gerak isokratik yang memenuhi parameter validasi meliputi selektivitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi. Metode yang telah dioptimasi dan divalidasi akan diaplikasikan untuk menetapkan kadar asam galat, kafein, dan EGCG dalam beberapa produk teh celup (teh hijau dan hitam) yang dijual di Indonesia. Kualitas produk teh dilihat dari kandungan senyawa fitokimianya khususnya asam galat, kafein dan epigalokatekin galat. Dengan menetapkan kadar senyawa tersebut, maka standar kualitas produk dapat dijaga dan ditingkatkan supaya memiliki daya saing.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel teh celup (teh hijau dan hitam) yang dijual di supermarket daerah Salatiga. Standar senyawa asam galat (derajat HPLC, kemurnian 98%), EGCG (derajat HPLC, minimal 80%), dan kafein (*reagent plus*) (dari Sigma Aldrich), asetonitril, metanol absolut dengan derajat *Liquid Chromatography* serta asam orto-fosfat 85% (derajat pro-analisis) (dari Merck), dan akuabides (Ikhapharmindo Putramas).

Optimasi Fase Gerak Sistem KCKT

Fase gerak dioptimasi dengan membuat berbagai variasi campuran pelarut. Variasi campuran bagian pertama mengacu pada penelitian Saito dkk. (2006) yang meliputi air, asetonitril, metanol, etil asetat, asam asetat glasial (89:6:1:3:1 v/v/v/v/v). Campuran pelarut yang dioptimalkan selanjutnya adalah air, asetonitril, metanol, etil asetat, asam asetat glasial (89:6:3:4:1 v/v/v/v/v), kemudian air, asetonitril, metanol, etil asetat, asam asetat glasial (89:7:1:3:3 v/v/v/v/v). Karena hasil belum optimal, maka divariasi campuran pelarut yang lain mengacu pada penelitian Prayong dkk. (2007) yaitu asam orto-fosfat 0,1%, metanol, asetonitril (16

: 1 : 3 v/v/v). Selanjutnya, variasi campuran pelarut yang dioptimalkan adalah asam *orto*-fosfat 0,1%, air, metanol, asetonitril (14:6:2:3 v/v/v); pH = 3,00. Untuk memperpendek waktu retensi dan menjaga kolom supaya umurnya panjang maka pH larutan fase gerak dibuat 4,00 dengan trietil amin (TEA) dalam campuran pelarut asam *orto*-fosfat 0,1%, air, metanol, asetonitril (14:7:1:3 v/v/v). Kromatogram dianalisis berdasarkan nilai resolusi ($R \geq 2,00$), plat teori ($N > 2000$) dan waktu retensi ($tR < 20$ menit).

Instrumentasi dan Kondisi Operasional KCKT

Sistem KCKT terdiri dari HPLC Knauer GmbH-Jerman Model Smart Line Series dengan detektor UV (Smart Line UV Detektor 2500 A 5140), pompa ganda Smart Line Pump 1000 V 7603, sampel injektor dengan volume 20 μ L Rheodyne Loop model A135. Kolom yang digunakan adalah Eurosphere C-18 (250 \times 4,6 mm i.d., 5 μ m). KCKT fase terbalik yang digunakan menggunakan sistem elusi fase gerak isokratik yaitu campuran asam *orto*-fosfat 0,1%, air, asetonitril, metanol (14:7:3:1 v/v/v/v) pada pH = 4,00 dengan kecepatan alir 1,2 mL/min serta dideteksi pada panjang gelombang 280 nm.

Validasi Metode

Uji selektivitas. Dibuat larutan campuran standar asam galat, kafein, dan EGCG dengan konsentrasi masing-masing 1 mg/mL dalam pelarut campuran asam *orto*-fosfat 0,1%, air, asetonitril, metanol (14:7:3:1 v/v/v/v) pada pH = 4,00. Sejumlah 20 μ L larutan standar yang sudah dicampur dan dihomogenkan diinjeksikan ke sistem KCKT hasil optimasi. Selektivitas dilihat dari nilai resolusi ($\geq 2,00$) (Snyder dkk., 1997) kromatogram satu senyawa dengan kromatogram senyawa lain.

Kurva kalibrasi dan linearitas. Untuk asam galat dibuat larutan standar 200 μ g/mL dalam pelarut campuran asam *orto*-fosfat 0,1%, air, asetonitril, metanol (14:7:3:1 v/v/v/v) pada pH = 4,00. Larutan diencerkan dengan fase gerak hingga didapatkan konsentrasi 4; 8; 10; 15; dan 18 μ g/mL. Untuk kafein, dibuat larutan standar 200 μ g/mL dalam pelarut campuran asam *orto*-fosfat 0,1%, air, asetonitril, metanol (14:7:3:1 v/v/v/v) pada pH = 4,00. Larutan diencerkan dengan fase gerak hingga didapatkan konsentrasi 10; 20; 30; 40; dan 50 μ g/mL. Untuk EGCG, dibuat larutan standar 200 μ g/mL dalam pelarut campuran asam *orto*-fosfat 0,1%, air, asetonitril, metanol (14:7:3:1 v/v/v/v) pada pH = 4,00. Larutan diencerkan dengan fase gerak hingga didapatkan konsentrasi 10; 20; 40; 80; dan 100 μ g/mL. Masing-masing, lima seri konsentrasi larutan standar tunggal yang sesuai diinjeksikan ke KCKT (dengan preparasi yang sudah dioptimasi) dan

diulang sebanyak 3 kali. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplotkan rata-rata luas area *peak* vs konsentrasi standar. Hasil plot adalah kurva linear, $y = bx + a$ dengan r sebagai determinan linearitas (Ermer dan Miller, 2005).

Limit of detection (LOD) dan limit of quantitation (LOQ). LOD dan LOQ ditentukan secara riil dengan menginjeksikan berbagai konsentrasi di bawah konsentrasi terendah yang digunakan untuk kurva kalibrasi hingga didapat rasio luas area/*noise* (S/N) ± 3 untuk LOD dan ± 10 untuk LOQ (Ermer dan Miller, 2005).

Presisi dan akurasi. Uji presisi ditentukan dengan menganalisis larutan standar pada 3 konsentrasi tertentu secara triplo dan masing-masing diulang 3 kali pada hari yang sama. Untuk asam galat, uji presisi dilakukan dengan menginjeksikan konsentrasi baku 8, 10, dan 12 μ g/mL. Untuk kafein, uji presisi dilakukan dengan menginjeksikan konsentrasi baku 40, 50, dan 60 μ g/mL. Untuk EGCG, uji presisi dilakukan dengan menginjeksikan konsentrasi baku 80, 100, dan 120 μ g/mL. Kadar zat masing-masing dihitung terhadap kurva baku untuk asam galat, kafein, dan EGCG. Presisi diukur berdasar parameter *relative standard deviation* (RSD) ($RSD \leq 2,0\%$) (Snyder dkk., 1997).

Tes *recovery* digunakan untuk menguji akurasi metode. Tes *recovery* dilakukan pada 3 konsentrasi berbeda dan masing-masing diulang 3 kali. Konsentrasi masing-masing larutan baku yang digunakan sama dengan yang digunakan pada uji presisi.

$$\% Recovery = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar teoritis}} \times 100\%$$

Aplikasi Metode (Saito dkk., 2006 yang Telah Dimodifikasi)

Sampel teh celup (hijau dan hitam masing-masing 3 merk) diambil tiga kantong secara acak dan dihomogenkan dengan cara dicampur dan diaduk. Sejumlah 0,5 g sampel diekstrak dengan 25,0 mL fase gerak. Ekstraksi dilakukan dengan *sonicator* selama 5 menit. Sebelum diinjeksikan, larutan analit disaring menggunakan mikrofilter 0,45 μ m dan diencerkan 10 kali dengan fase gerak. Sejumlah 20 μ L kemudian diinjeksikan ke dalam injektor KCKT. Masing-masing sampel diulang 3 kali dengan masing-masing ulangan dilakukan 3 kali penyuntikan ke sistem KCKT. Untuk menghitung kadar zat yang dianalisis, luas area masing-masing kromatogram senyawa yang dituju (asam galat, kafein, EGCG) yang terkandung dalam sampel yang didapat diplotkan ke persamaan regresi linear kurva baku.

HASIL DAN PEMBAHASAN

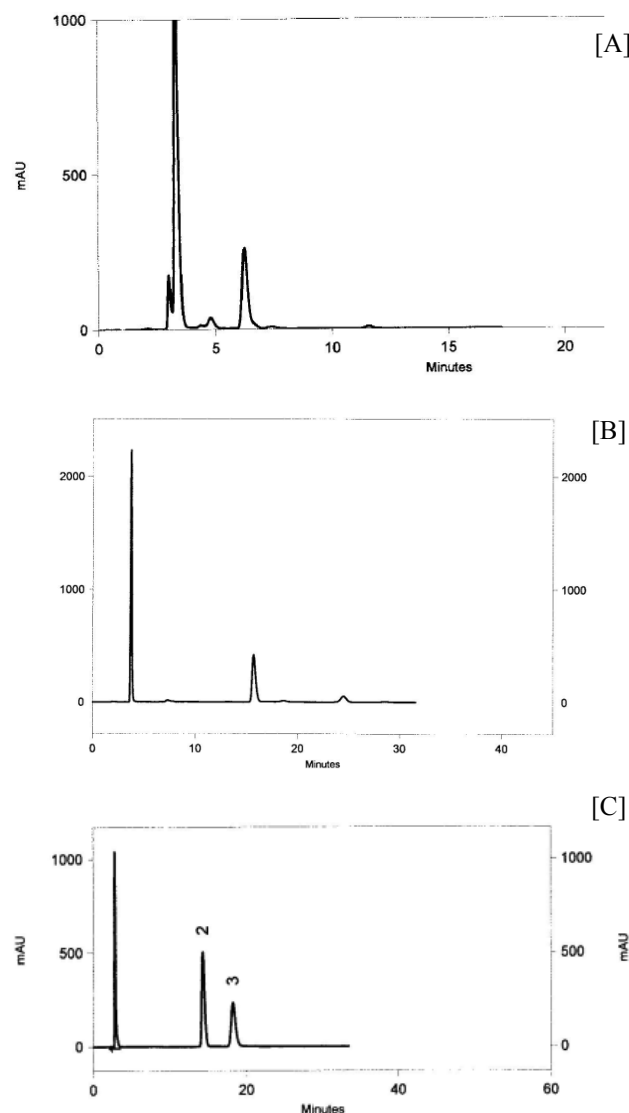
Optimasi Fase Gerak

Senyawa yang dianalisis menyerap sinar UV karena memiliki kromofor berupa gugus cincin aromatis dengan sistem konjugasi dan aoksokrom hidroksi (-OH) (Snyder dkk., 1997). Dari literatur didapatkan dua panjang gelombang optimum serapan senyawa-senyawa katekin, kafein dan polifenol dalam teh, yaitu pada panjang gelombang 210 dan 280 nm. Tetapi, pada panjang gelombang 210 nm, kromatogram akan terinterferensi oleh *noise* yang dapat ditimbulkan oleh serapan-serapan pelarut organik seperti metanol dan asetonitril (Saito dkk., 2006). Oleh karena itu, panjang gelombang yang dipilih adalah pada panjang gelombang 280 nm. Karena senyawa yang dianalisis memiliki serapan kuat pada daerah UV sehingga detektor UV dinilai cukup sensitif untuk mendeteksi serapan sinar UV oleh senyawa yang dianalisis.

Optimasi fase gerak dilakukan untuk mendapatkan profil kromatogram senyawa asam galat, kafein, dan EGCG yang mempunyai nilai resolusi $\geq 2,00$. Komposisi fase gerak pertama yang dicoba adalah seperti pada penelitian Saito dkk., (2006) yaitu: air, asetonitril, metanol, etil asetat, asam asetat glasial. Berbagai variasi komposisi fase gerak yang telah dicoba untuk mendapatkan nilai resolusi $\geq 2,00$ adalah (i) 89:6:1:3:1 (v/v/v/v/v), (ii) 86:6:3:4:1 (v/v/v/v/v), dan (iii) 86:7:1:3:3 (v/v/v/v/v). Profil kromatogram yang didapat ternyata belum memberikan resolusi yang sempurna untuk kromatogram asam galat dan kafein, yaitu $R = 0,56$ (Gambar 2A).

Resolusi dipengaruhi oleh faktor selektivitas, selain faktor kapasitas dan nilai plat teori. Salah satu cara untuk mencapai selektivitas yang diharapkan adalah dengan merubah jenis pelarut yang digunakan untuk fase gerak (Snyder dkk., 1997). Komposisi fase gerak lain yang kemudian dioptimalkan adalah berdasarkan penelitian Prayong dkk. (2007), yaitu asam *orto*-fosfat 0,1%, metanol, asetonitril. Penambahan air dalam komposisi fase gerak dan pengaturan pH (pH = 3,00) ternyata dapat menghasilkan resolusi kromatogram senyawa yang dituju sesuai nilai yang diharapkan ($R \geq 2,00$), yaitu 8,00 untuk senyawa asam galat dengan kafein dan 3,81 untuk senyawa kafein dengan EGCG. Tetapi, waktu analisis yang dibutuhkan masih lebih dari 20 menit (Gambar 2B). Untuk mengatasi hal ini, pH larutan dinaikkan menjadi 4,00 dengan trietil amin (TEA). Peningkatan pH berpengaruh terhadap senyawa asam lemah yang terionisasi seperti asam galat dan EGCG, dimana retensi senyawa-senyawa yang terionisasi dengan fase diam akan menjadi lemah sehingga waktu retensinya menjadi pendek (Snyder dkk., 1997). Fase gerak optimum yang dicapai adalah asam *orto*-fosfat 0,1%, air,

metanol, asetonitril (14:7:1:3 v/v/v/v) pada pH = 4,00. Nilai pemisahan (R) yang dicapai untuk asam galat dan kafein adalah 24,80 sedangkan kafein dengan EGCG adalah 4,56. Profil kromatogram ditunjukkan pada Gambar 2C.

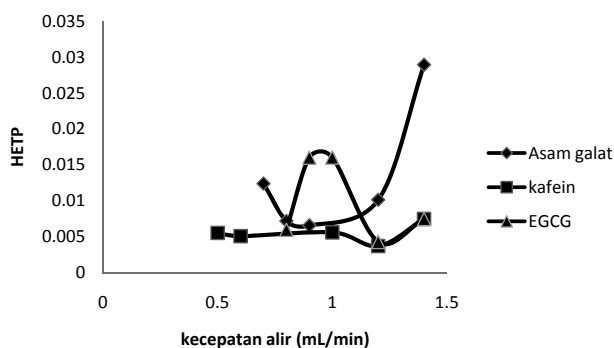


Gambar 2. [A]. Profil Kromatogram (1) asam galat (tR 3,95 min), (2) kafein (tR 4,15 min), (3) EGCG (tR 7,15 min) dengan kecepatan alir 1,2 mL/min. Fase gerak air, asetonitril, metanol, etil asetat, asam asetat glasial (89:6:3:4:1 v/v/v/v/v)
 [B]. Profil Kromatogram (1) asam galat (tR 3,750 min), (2) kafein (tR 15,700 min), (3) EGCG (tR 24,500 min) dengan kecepatan alir 1,2 mL/min. Fase gerak asam *orto*-fosfat 0,1%, air, metanol, asetonitril (14:6:2:3 v/v/v); pH = 3,00.
 [C]. Profil Kromatogram (1) asam galat (tR 3,35 min), (2) kafein (tR 12,15 min), (3) EGCG (tR 15,80 min) dengan kecepatan alir 1,2 mL/min. Fase gerak asam *orto*-fosfat 0,1% : air : asetonitril : metanol dengan perbandingan (14:7:3:1 v/v/v/v) pH = 4,00

Optimasi Kecepatan Alir

Optimasi kecepatan alir dilakukan dengan memvariasi kecepatan alir 0,9; 1,0; 1,2 dan 1,4 mL/min. Berdasarkan kurva Van Deemter, yang menghubungkan kecepatan alir dengan nilai *Height Equivalent of A Theoretical Plate* (HETP), kecepatan alir optimum dicapai saat nilai HETP terkecil dan pada saat nilai plat teori (N) terbesar (Snyder dkk., 1997).

Pada Gambar 3, hasil optimasi kecepatan alir fase gerak untuk asam galat adalah 0,9 mL/min. Namun demikian, pada kecepatan alir ini, kromatogram untuk senyawa kafein dan EGCG memiliki nilai plat teori, $N < 2000$. Optimasi kecepatan alir fase gerak untuk senyawa kafein dan EGCG yang dicapai adalah kecepatan alir optimum 1,2 mL/min. Selanjutnya, kecepatan alir fase gerak yang akan digunakan adalah 1,2 mL/min dimana pada kecepatan alir ini, N yang didapat untuk semua kromatogram senyawa yang dituju lebih besar dari 2000.



Gambar 3. Profil kurva Van Deemter optimasi kecepatan alir dengan fase gerak asam *orto*-fosfat 0,1% : air : asetonitril : metanol (14:7:3:1 v/v/v/v pH = 4,00) untuk masing-masing senyawa asam galat, kafein dan EGCG.

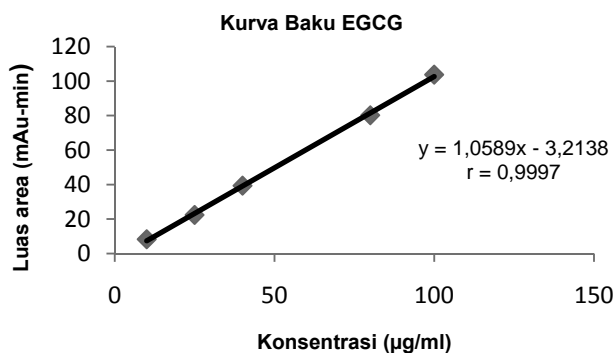
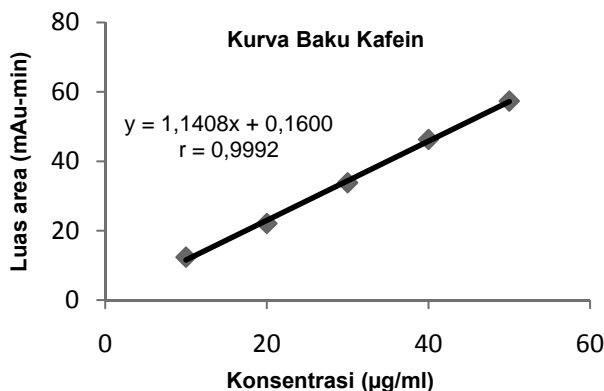
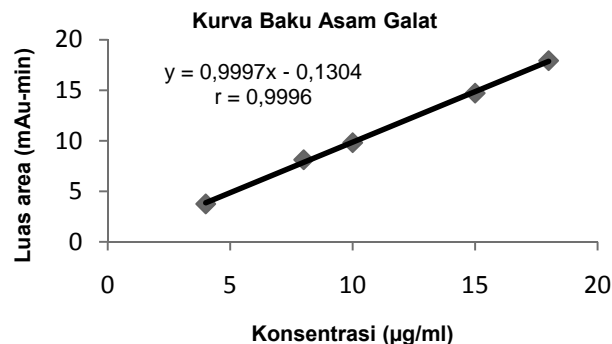
Validasi Metode

Uji selektivitas. Selektivitas dilihat dari resolusi untuk masing-masing kromatogram haruslah memberikan nilai $R \geq 2,00$ (Ermer dan Miller, 2005). Semua kromatogram untuk senyawa yang dituju memiliki nilai resolusi $\geq 2,00$ (Gambar 2C).

Uji linearitas. Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Ahuja dan Dong, 2005). Hasil yang didapatkan menunjukkan masing-masing kurva baku senyawa yang dituju memiliki linearitas yang dapat diterima, dimana nilai $r \geq 0,999$ (Tabel 1 dan Gambar 4) (Ahuja dan Dong, 2005).

Tabel 1. Hasil uji linearitas, LOD, dan LOQ asam galat, kafein, dan EGCG secara KCKT isokratik

Senyawa	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Linearitas		
			slop (b)	intersep (a)	R
Asam galat	0,07	0,30	0,9997	- 0,1304	0,9996
Kafein	0,30	0,50	1,1408	+ 0,1600	0,9992
EGCG	1,00	1,40	1,0589	- 3,2138	0,9997



Gambar 4. Kurva kalibrasi (konsentrasi vs luas area) masing-masing standar dalam asam *orto*-fosfat 0,1%: metanol: asetonitril: air (14:1:3:7 v/v/v/v pH = 4,00) (n=5)

Uji kecermatan (akurasi). Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan

kadar analit yang sebenarnya. Rata-rata persen *recovery* yang diterima adalah dalam kisaran 98-102% (Ermer dan Miller, 2005).

Pada Tabel 2 terlihat bahwa % *recovery* untuk masing-masing senyawa yang dituju adalah pada kisaran 98-102%. Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa metode KCKT isokratik yang dikembangkan pada penelitian ini memiliki akurasi yang dapat diterima menurut Ermer dan Miller (2005) yang menyatakan bahwa akurasi dapat diterima bila rata-rata persen *recovery* berada pada kisaran 98-102%.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa akurasi metode lebih tinggi pada kadar 80% rentang kurva baku yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa pada kadar yang tinggi (120%) kecenderungan penyimpangan lebih besar. Penyimpangan ini dapat dimungkinkan karena pada konsentrasi yang tinggi maka kapasitas adsorpsi partikel fase diam dalam kolom menjadi jenuh sehingga pemisahan kurang efektif (Snyder dkk., 1997). Selain itu, konsentrasi yang tinggi dapat menyebabkan penyimpangan hukum Lambert-Beer dikarenakan jarak antar partikel yang sangat dekat mempengaruhi perilaku spesies kimia penyerap sinar UV (Skoog dan Leary, 1996).

Uji presisi. Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang-ulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran homogen (Harmita, 2004). Menurut Ermer dan Miller, (2005), presisi dapat diterima jika RSD dari pengujian $\leq 2,00\%$.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa untuk parameter luas area dan waktu retensi baik senyawa asam galat, kafein, maupun EGCG memiliki presisi yang dapat diterima menurut Ermer

dan Miller (2005), hal tersebut terlihat dari nilai RSD yang diperoleh $\leq 2,00\%$. Untuk parameter tinggi puncak, khususnya untuk tinggi puncak kromatogram senyawa EGCG memiliki presisi yang tidak memenuhi kriteria, yaitu nilai RSD $> 2,00\%$. Dengan alasan tersebut, penetapan kadar asam galat, kafein, dan EGCG menggunakan kurva kalibrasi berdasar luas area kromatogram vs konsentrasi.

Uji LOD dan LOQ. Pada penelitian ini, penentuan LOD dan LOQ dilakukan dengan menginjektikan berbagai konsentrasi secara terpisah hingga didapat rasio *signal/noise* (S/N) ± 3 untuk LOD dan ± 10 untuk LOQ. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan memiliki sensitivitas yang cukup bagus (Tabel 1). Bila dibandingkan dengan metode yang dikembangkan Li He dkk. (2007) menunjukkan bahwa nilai LOD dan LOQ penetapan kadar EGCG adalah 0,1 mg/mL dan 0,3 mg/mL secara berturut-turut. Sedangkan metode yang dikembangkan Prayong dkk. (2007) memiliki LOD dan LOQ yang lebih kecil yaitu < 20 ng/mL, tetapi dengan profil kromatogram yang belum dijamin nilai plat teorinya. Sedangkan metode yang dikembangkan Saito dkk. (2006) belum dijamin validasi metodenya termasuk nilai LOD dan LOQ.

Penetapan Kadar Asam Galat, Kafein, dan EGCG dalam Sampel

Sampel teh yang digunakan adalah produk teh celup hijau dan hitam yang sudah mengalami pemrosesan di pabrik. Pada teh hijau celup, kadar EGCG berkisar antara 2,08-3,96%. Kadar kafein teh jenis ini berkisar antara 1,52-1,69%. Kadar senyawa asam galat sendiri berkisar antara 0,45-0,50% (Tabel 3). Bila dibandingkan dengan penelitian Saito dkk. (2006), kadar EGCG yang didapat lebih rendah yaitu untuk

Tabel 2. Hasil uji akurasi (rata-rata % *recovery*) dan presisi (keterulangan, %RSD) dari senyawa asam galat, kafein, dan EGCG secara KCKT isokratik

Senyawa	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata luas area (mAu-min)	Kadar terukur (µg/mL)	<i>recovery</i> (%)	Rata-rata <i>recovery</i> (%)	Luas area (mAu-min) % RSD	Tinggi puncak (mAu) % RSD	Waktu retensi (min) % RSD
Asam galat	8	40336,3	8,20	102,50	100,88	0,63	0,83	0,29
	10	495082	10,04	102,95		1,07	1,21	0,00
	12	591716	11,97	99,75		0,63	0,71	0,17
Kafein	40	1539097	40,33	100,83	99,22	1,26	0,93	0,10
	50	1825674	47,87	95,74		1,54	1,64	0,16
	60	2107682	55,28	92,14		1,39	1,48	0,08
EGCG	80	1683449	82,13	102,79	99,67	0,48	3,00	0,68
	100	1763313	102,95	102,95		1,71	2,84	0,39
	120	1922012	111,94	93,28		0,35	2,69	0,65

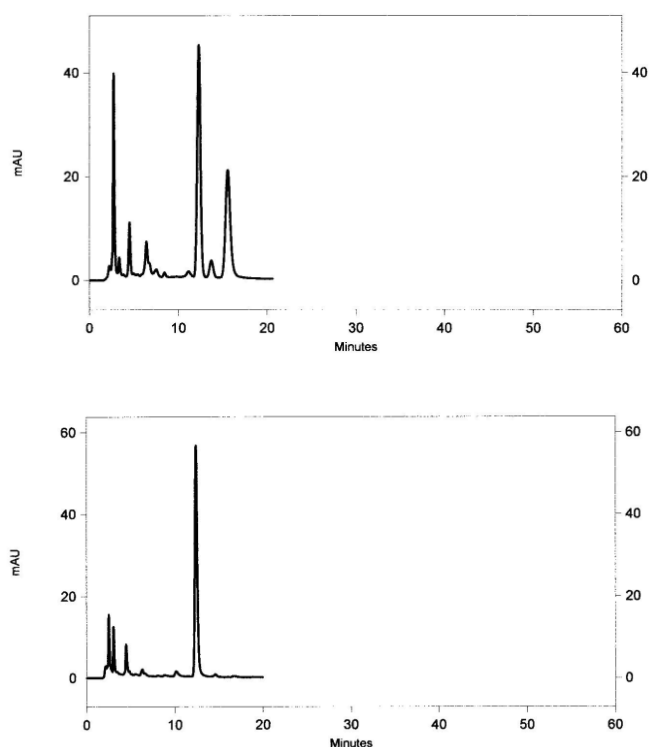
sampel *Chinese green tea* dan *Japanese green tea* berkisar antara 4,03-4,68%. Untuk kafein, kadarnya berkisar antara 2,09-2,32%. Pada penelitian Prayong dkk. (2007) didapatkan kandungan EGCG dalam berbagai produk teh hijau berkisar antara 0,21-9,63%. Kandungan kafein yang didapat pada penelitian yang sama berkisar antara 0,49-4,87%, sedangkan kadar asam galatnya berkisar antara 0,015-0,104%.

Tabel 3. Kandungan asam galat, kafein, dan EGCG (n = 5) dari berbagai produk teh hijau dan hitam dalam bentuk sediaan teh celup

Jenis teh	Merk	asam galat (% b/b) (%RSD)	kafein (% b/b) (%RSD)	EGCG (% b/b) (%RSD)
Hijau	A ₁	0,46 (2,2)	1,52 (2,7)	3,96 (17,0)
	B ₂	0,45 (5,2)	1,69 (7,6)	2,08 (14,3)
	C ₃	0,50 (4,7)	1,60 (4,4)	2,23 (7,7)
Hitam	A ₁	0,16 (4,3)	1,57 (4,8)	tidak terkuantitasi
	B ₂	0,19 (9,2)	1,35 (9,7)	tidak terkuantitasi
	C ₃	0,23 (6,2)	1,68 (7,4)	tidak terkuantitasi

Perbedaan kadar asam galat, kafein, dan EGCG tersebut sangat dimungkinkan karena kandungan senyawa fitokimia di dalam daun teh sangat dipengaruhi oleh kualitas daun teh yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan produk teh. Kualitas teh ditentukan oleh kandungan senyawa katekin dan turunannya yang dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah kondisi lingkungan tempat tanaman teh ditanam (keadaan tanah, ketinggian, iklim), musim panen, dan proses pengolahan teh di pabrik (Hara, 2001; Ho dkk., 2008).

Untuk produk teh hitam celup, kandungan asam galat sangat berkurang bila dibandingkan dengan produk teh hijau celup, yaitu berkisar antara 0,16-0,23%. Bahkan, kandungan EGCG pada produk teh hitam celup menurun sangat drastis (Gambar 5), dimana kandungannya sampai tidak terkuantitasi (Tabel 3). Hal ini disebabkan oleh faktor pengolahan teh segar menjadi teh hitam. Pada proses pengolahan teh hitam, teh mengalami proses fermentasi oksidatif. Pada proses ini, senyawa-senyawa katekin dan turunannya seperti EGCG termasuk senyawa polifenol lain seperti asam galat akan teroksidasi oleh udara yang dikatalisis oleh polifenol oksidase. Fermentasi oksidatif ini akan menghasilkan senyawa *theaflavin* dan *thearubigin*. Kedua senyawa ini sangat mempengaruhi warna dan cita rasa teh hitam (Zhen, 2002; Hara, 2001). Kandungan kafein bila dibandingkan dengan teh hijau celup tidak banyak berbeda kadarnya (% b/b) yaitu 1,35-1,68%. Proses fermentasi oksidatif pada daun teh ternyata tidak begitu mempengaruhi kandungan senyawa kafein (Zhen, 2002).



Gambar 5. Profil kromatogram sampel (A) teh celup hijau; (B) teh celup hitam: (1) asam galat (tR 2,717 min); (2) kafein (tR 12,283 min), (3) EGCG (tR 15,533 min)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa: hasil optimasi metode KCKT untuk penetapan kadar asam galat, kafein, dan EGCG dengan kolom Eurosphere RP C-18 (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm) menunjukkan kondisi optimum fase gerak berupa campuran asam *orto*-fosfat 0,1%, metanol, asetonitril, air (14:1:3:7 v/v/v/v) pada pH = 4,00 dengan kecepatan alir 1,2 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 280 nm. Metode yang dikembangkan dapat memenuhi syarat-syarat validasi metode dan telah digunakan untuk menganalisis beberapa produk teh celup (teh hijau dan hitam). Pada teh hijau, kandungan terbesar adalah EGCG diikuti kafein. dan asam galat sedangkan pada teh hitam, EGCG tidak terkuantitasi.

DAFTAR PUSTAKA

Ahuja, S. dan Dong, M.W. (2005). *Hand Book of Pharmaceutical Analysis By HPLC*, Volume 6, Separation Science and Technology, Elsevier Inc., London.

- Anonim (2008). Sixty-Fourth Report On Export Of Tea. <http://rajyasabha.nic.in>. [20 Oktober 2008].
- August, D.A., Landau, J., Caputo, D., Hong, J., Lee, M.J. dan Yang, C.S. (1999). Ingestion of green tea rapidly decreases prostaglandin E2 levels in rectal mucosa in humans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **8**: 709-713.
- Cabrera, C., Gimenez, R. dan Carmen Lopez, M. (2003). Determination of tea components with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem* **51**: 4427-4435.
- Ermer, J. dan Miller, H.M. (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide To Best Practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.
- Gafner, S., Bergeron, C., Batcha, L.L. dan Angerhofer, C.K. (1999). *Free Radical Scavenging Activities of Different Extracts of Green Tea (Camellia sinensis)*. Tom's of Maine, New York.
- Hara, Y. (2001). *Green Tea, Health Benefit and Applications*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Harmita (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* **1**: 117-135.
- Ho, C.T., Lin, J.K. dan Shahidi, F. (2008). *Tea and Tea Products: Chemistry and Health – Promoting Properties*. CRC Press, New York.
- Li He, Penzotti, S. dan Bedu-Addo, F. (2007). *An Improved Quantitative Reverse Phase HPLC Method to Monitor Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Six Related Compounds*. Cardinal Health Pharmaceuticals Development, USA.
- Miura, Y., Chiba, T., Tomita, I., Koizumi, H., Miura, S., Umegaki, K., Hara, Y., Ikeda, M. dan Takako, T. (2001). Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J. Nutr* **22**: 27-32.
- Murakami, I., Nakamura, T., Ishibashi, Y., Shibuya R., Ayano, E., Morita-Murase, Y., Nagata, Y. dan Kanazawa, H. (2006). Simultaneous determination of catechin and procyanidins in bottle tea drinks by LC/MS. *Chromatography* **27**: 259-265.
- Prayong, P., Weerapreeyakula, N. dan Sripanidkulchaia, B. (2007). Validation of isocratic eluting and stepwise flow rate gradient for HPLC determination of catechins, gallic acid and caffeine in tea. *Science Asia* **33**: 113-117.
- Saito, S.T., Welzel, A., Suyenaga, E.S. dan Bueno, F. (2006). A Method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* **26**: 394-400.
- Skoog, D.A. and Leary, J.L. (1996). *Principles of Instrumental Analysis*, Sixth Edition. Sounder College Publishing, USA.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. dan Glajch, J.L. (1997). *Practical HPLC Method Development*, 2nd Ed. John Wiley & Son Inc., New York.
- Svobodova, A., Psotova, J. dan Walterova, D. (2003). Natural phenolics in prevention of UV-induced skin damage (A review). *Biomed. Papers* **147**: 137-145.
- Zhen, Y. (2002). *Tea, Bioactivity and Therapeutic Potential*. Taylor and Francis, New York.