

Analisis individual katekin teh hijau hasil ekstraksi dan fraksionasi kromatografi kolom

Analysis of individual catechin from green tea extracted and fractionated by column chromatography

Dadan Rohdiana dan Shabri

*Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung
Pasirjambu, Kabupaten Bandung; Kotak Pos 1013 Bandung 40010
Telepon 022 5928780, Faks. 022 5928186*

Diajukan: 10 Juli 2012; diterima 10 Agustus 2012

Abstract

A study determination of solvent and eluent on extraction process and fractionation of individual catechin especially epigallocatechin gallate (EGCG) by column chromatography method. This study divided on two steps, i.e. determination of raw material, solvent, process optimization for extraction and fractionation of green tea extract, evaporation and drying. Characterization of polyphenol conducted by visible spectrophotometer, analysis of individual catechin by HPLC. This study was did in Laboratory of Processing Technology and Laboratory of Testing for Tea and Cinchona, Research Institute for Tea and Cinchona, at September 2007 up to March 2008. Result of this study shown that ratio of solvent acetone and water 7:3 v/v, ratio of tea and solvent 1:15 w/v for 15 minutes at 55-60°C obtained 53.39% polyphenol on extract and yield gradiently produce extract with purity of catechin is 94% b/b, EGCG 64.03% from feed with catechin content is 82.96% w/w and EGCG 42.34% w/w.

Keywords: *green tea, tea extract, catechin fractionation, column chromatography*

Abstrak

Telah dilakukan penelitian penentuan pelarut dan eluen dalam proses ekstraksi dan fraksionasi katekin menjadi individual katekin terutama epigalokatekin galat (EGCG) menggunakan metode kromatografi kolom. Penelitian dibagi dalam beberapa tahap yaitu pemilihan bahan baku, pemilihan pelarut, optimasi waktu dan rasio teh-pelarut dalam proses ekstraksi, fraksionasi katekin dari ekstrak teh hijau, pengkonsentrasian dan pengeringan. Karakterisasi yang dilakukan adalah analisa polifenol menggunakan spektrofotometer visibel, analisa katekin (epigalokatekin galat, epikatekin galat, epigalokatekin, epikatekin, katekin, gallokatekin) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Pengolahan Hasil dan Laboratorium Pengujian Teh dan Kina, Pusat Penelitian Teh dan Kina, waktu penelitian September 2007 sampai Maret 2008. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil optimum dari proses ekstraksi adalah menggunakan pelarut aseton-air (70:30 v/v), rasio teh/pelarut 1 : 15 b/v, selama 15 menit pada suhu 55-60°C diperoleh kadar total polifenol 53,30% b/b dalam ekstrak dan rendemen 40,17% b/b. Fraksionasi dua kali elusi menggunakan fase diam silika gel dan eluen etil asetat-etanol 90% (1 : 1 v/v) secara bergradien menghasilkan

ekstrak berkadar total katekin 94% b/b dengan EGCG 64,03% dari umpan berkadar total katekin 82,96% b/b dengan EGCG 42,34% b/b.

Kata kunci: teh hijau, ekstraksi teh, fraksinasi katekin, kromatografi kolom

PENDAHULUAN

Polifenol merupakan senyawa yang tersedia secara alami pada teh yang bertanggungjawab terhadap ketajaman rasa dan aroma yang unik. Disamping itu, polifenol memiliki potensi antioksidan yang demikian kuat. Kandungan polifenol dalam daun teh berkisar antara 25-35% berat kering. Tinggi rendahnya kandungan kimia dalam teh termasuk polifenol sangat dipengaruhi oleh jenis klon, variasi musim, kesuburan tanah, perlakuan kultur teknis, umur daun, intensitas sinar matahari yang diterimanya dan faktor-faktor pendukung lainnya.

Kandungan polifenol dalam tanaman teh (*Camellia sinensis*) *varietas assamica* lebih tinggi bila dibandingkan dengan *varietas sinensis*. Alasan inilah yang menjadi sandaran mengapa teh Indonesia yang sebagian besar berbahan baku *varietas assamica* lebih potensial daripada teh Jepang atau China yang berbahan baku *varietas sinensis*. Diantara sejumlah polifenol yang tersedia dalam teh, katekin merupakan senyawa yang paling banyak menyita perhatian. Sejumlah riset terkini menyatakan bahwa katekin merupakan senyawa yang paling berperan dalam efek kesehatan yang diterbitkan oleh teh, baik itu teh hitam, teh hijau maupun teh oolong.

Dengan meningkatnya perhatian masyarakat terhadap manfaat kesehatan dari katekin teh, mendorong para peneliti untuk memperoleh katekin dalam bentuk ekstrak.

Beberapa metode pemisahannya pun mulai dikembangkan. Baik di Jepang maupun di China, penggunaan pelarut-pelarut organik sampai dengan menggunakan membran semipermeabel sudah banyak dilakukan.

Hara (1995) menggunakan pelarut air, kloroform dan etil asetat untuk memperoleh katekin kasar. Druzynska, *et al.*, (2007) menggunakan aseton 70%, etanol 70% dan air untuk mengekstraksi polifenol. Ekstraksi menggunakan membran ultrafiltrasi dan osmosis balik dilakukan oleh Zhang dan Matsuuro (1991). Rohdiana dan Shabri (2007) melakukan pemisahan katekin dari komponen makromolekul dan kafein menggunakan membran mikrofiltrasi, ultrafiltrasi dan nanofiltrasi serta osmosis balik. Burdick and Carl (2001) telah mempatenkan proses produksi epigallocatekin galat menggunakan berbagai absorbent dari bahan baku ekstrak polifenol "Polyphenon®". Amarowicz, *et al.*, (2003) telah memisahkan individual katekin dari teh hijau menggunakan kolom silika gel dan kromatografi cair kinerja tinggi (*high performance liquid chromatography*). Mengingat peranannya yang demikian penting, maka penelitian terkait katekin termasuk fraksinasi pada teh hijau yang diolah dengan kombinasi steaming dan CTC (Crushing, Tearing and Curling) perlu dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kandungan individual katekin teh hijau hasil fraksinasi kromatografi kolom.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Pengujian mutu dan pelayanan, Pusat Penelitian Teh dan Kina pada tahun 2010. Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah teh hijau yang diolah dengan kombinasi sistem *steaming* dan CTC (Crushing, Tearing and Curling) yang diperoleh dari Laboratorium Pilot Plan Bagian Teknologi Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung, Bandung, Jawa Barat.

Bahan percobaan

Absorben (fase diam): silika gel untuk kromatografi kolom 70-230 mesh, Ekstraksi pelarut: aquades, etanol, aseton, etil asetat, heksan, kloroform, dikloro-metan. Eluent: aquades, kloroform, etil asetat, etanol.

Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis berupa aquades, metanol, standar asam tanat, reagen fero sulfat dan kalium natrium tartrat, dinatrium hidrogen pospat, kalium dihidrogen pospat, enam standar katekin meliputi catechin (C), epicatechin (EC), galocatechin (GC), epigallocatechin-3-galat (EGCG), epigallocatechin (EGC), epicatechin galat (ECG). Pelarut atau eluen meliputi aquades, asam pospat, asetonitril grade KCKT, etil asetat, kloroform, metanol grade KCKT.

Metode

Preparasi sampel teh hijau

Sebanyak 2 gr teh hijau dilarutkan dengan 100 ml aquades, pipet 50 ml ke dalam corong pisah 250 ml, lalu dicuci menggunakan kloroform sebanyak 50 ml. Lalu dikocok 2 menit dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, lapisan bawah adalah lapisan kloroform dipisahkan dan

lapisan atas adalah lapisan air. Pekerjaan ini diulang 3 kali. Lapisan air diambil untuk diekstraksi dengan etil asetat 50 ml dalam corong pisah 250 ml. Lalu dikocok selama 2 menit dan dibiarkan hingga terbentuk 2 lapisan. Lapisan atas berupa etil asetat diambil dan lapisan bawah diekstraksi kembali dengan etil asetat dengan volume yang sama, diulang sebanyak 4 kali. Kemudian lapisan etil asetat diuapkan menggunakan rotavapor pada suhu 60°C sampai kering. Ekstrak kering dilarutkan dengan 100 ml pelarut (fase gerak KCKT), dipipet 1 ml untuk diencerkan dalam labu 25 ml (Yoshida *et al.*, 1999; Zhang and Maturaa, 1991).

Pemilihan eluen

Fraksionasi komponen katekin dari teh hijau menggunakan pelarut (eluen) dari literatur (Amarowicz *et al.*, 2003) yaitu campuran kloroform-metanol-air (65 : 35 : 10 v/v/v), kemudian dilakukan percobaan penggunaan kombinasi eluen berbasis etil asetat dan etanol. Hal ini dilakukan untuk menggantikan pelarut kloroform dan metanol, karena kedua pelarut ini sangat toksik.

Preparasi ekstrak umpan kolom

Sebanyak 200 gr teh hijau diekstraksi dengan 2 x 1.500 ml aseton 70% dalam air selama 15 menit (sesuai hasil optimasi ekstraksi menggunakan pelarut aseton). Ampas/ residu dibuang dan diperoleh filtrat sebanyak 2.400 ml atau 2,4 L, lalu filtrat dipisahkan menggunakan evaporator putar hampa pada suhu 60°C sampai diperoleh konsentrat ± 500 ml. Konsentrat diekstraksi cair-cair dengan 4 x 100 ml dikloro metan (metilen klorida). Fase dikloro metan dibuang, fase air diekstraksi katekinnya dengan 5 x 200 ml etil asetat. Fase air

dibuang dan fase etil asetat dikonsentratkan pada suhu 60°C kondisi hampa hingga hilang bau pelarut organiknya. Konsentrat dikeringkan hingga diperoleh bubuk ekstrak kering sebanyak 40 gram berkadar air 6%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

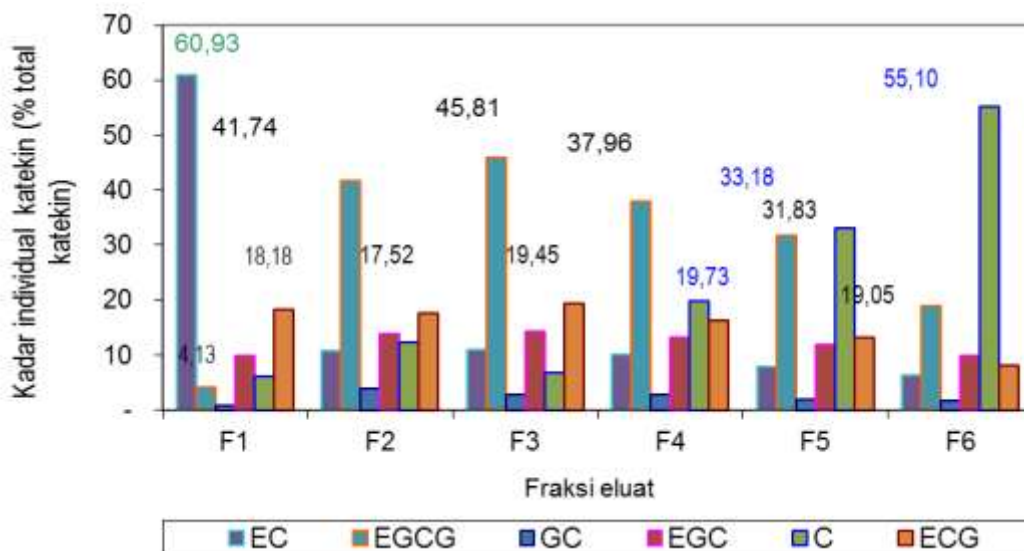
Kadar komponen individual katekin

Proses fraksinasi bertujuan untuk memperoleh katekin teh hijau berkadar EGCG yang tinggi dengan cara mengeliminasi komponen katekin yang lain. Kombinasi pelarut yang dicoba adalah (a) etanol 90%, (b) etil asetat-etanol 90% (1 : 1 v/v), (c) etil asetat-etanol 90% secara bergradien (etil asetat, etil asetat-etanol 1:1, etanol), (d) kloroform-metanol-air (65 : 35 : 10 v/v/v) sebagai kontrolnya.

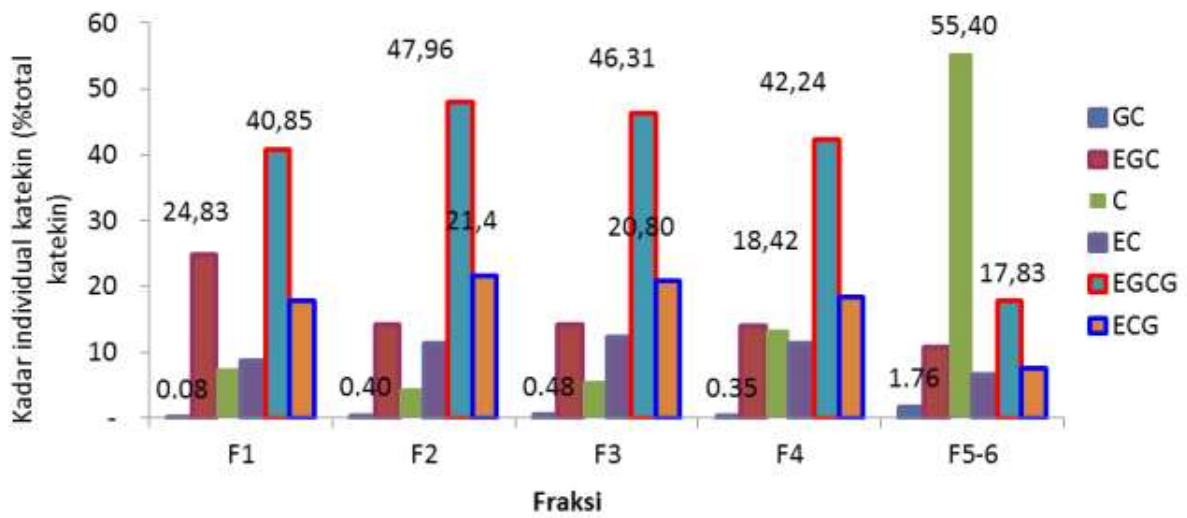
Gambar 1 menunjukkan bahwa fraksinasi menggunakan etanol 90% atau etanol-air (9:1) diperoleh 6 fraksi utama. Hasil analisis pada ke-6 fraksi utama tersebut menunjukkan bahwa fraksi 1 mengan-

andung dua komponen utama yaitu EC sebesar 60,93% dan ECG 18,18%; fraksi 2 mengandung EGCG 41,74% dan ECG 17,52%; fraksi 3 mengandung EGCG hingga 45,81% dan ECG 19,45%, fraksi 4 mengandung EGCG 39,96% dan C 19,73%, fraksi 5 mengandung C 33,18% dan EGCG 31,83%, dan fraksi 6 didominasi oleh C 55,10%. Hasil analisis diatas juga menunjukkan bahwa fraksi 2 dan 3 mengandung EGCG yang sangat dominan.

Berbeda dengan hasil fraksinasi menggunakan pelarut etanol yang menghasilkan 6 fraksi utama, fraksinasi menggunakan etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v) seperti yang terlihat pada Gambar 2 diatas menghasilkan 5 fraksi utama. Fraksi 1 mengandung dua komponen utama berupa EGCG sebesar 40,85% dan EGC 24,83%. Fraksi 2, 3 dan 4 mengandung EGCG masing-masing sebesar 47,96%; 46,31%; dan 42,24% serta ECG masing-masing sebesar 21,4%; 2,8%; dan 18,42%. Sedangkan fraksi 5 didominasi senyawa C sekitar 55,4%.

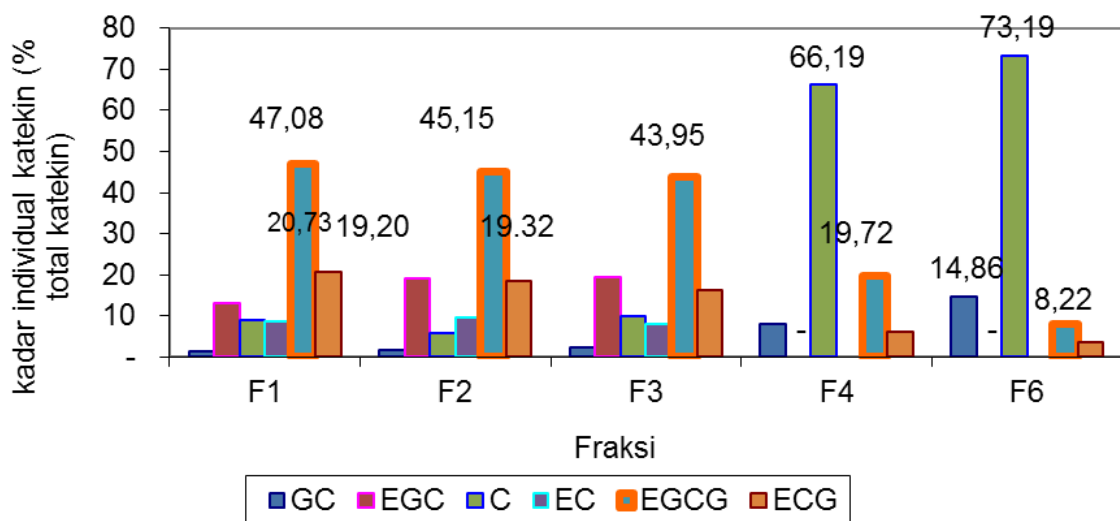


GAMBAR 1
Perolehan EGCG dari fraksinasi satu tahap menggunakan eluen etanol 90%.



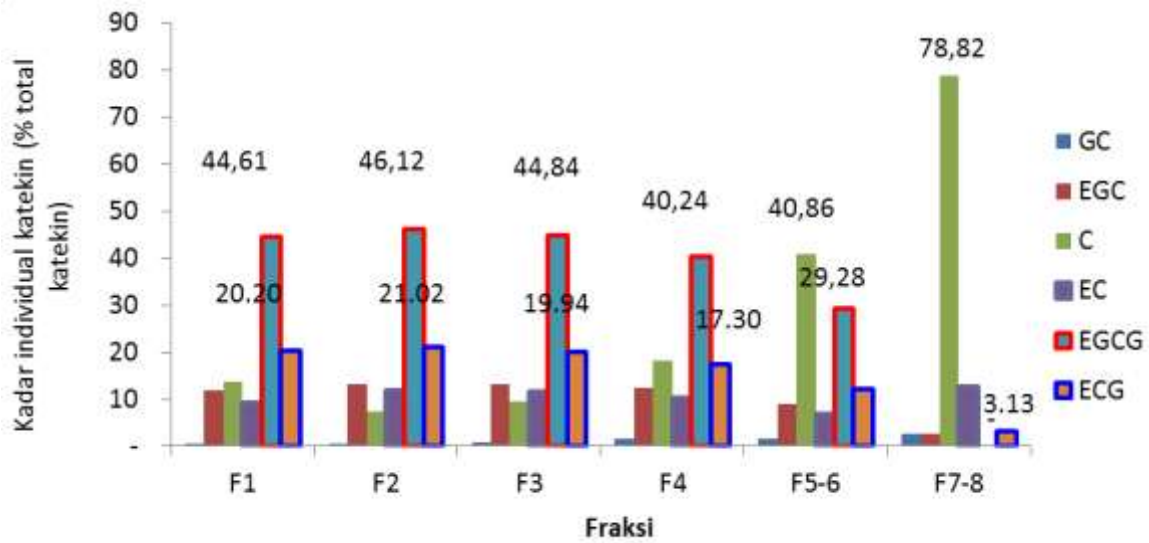
GAMBAR 2

Perolehan EGCG dari fraksinasi satu kali menggunakan eluen etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v).

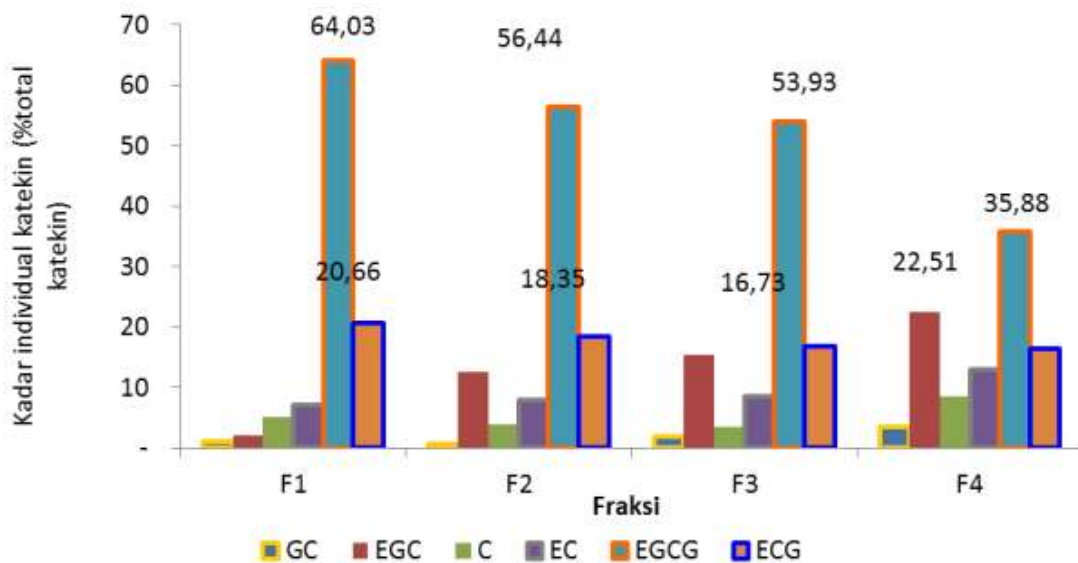


GAMBAR 3

Perolehan EGCG dari fraksinasi satu kali Menggunakan eluen etil asetat-etanol (1:1) secara bergradien.



Gambar 4
Perolehan EGCG dari fraksionasi satu tahap menggunakan eluen kloroform-metanol-air (65:35:10 v/v/v).



GAMBAR 5
Perolehan EGCG dari fraksionasi dua tahap menggunakan eluen etil asetat-etanol 90% (1:1) secara bergradien

Seperti halnya hasil fraksionasi menggunakan etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v), fraksionasi menggunakan eluen etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v) secara bergradien juga menghasilkan 5 fraksi utama. Fraksi 1 mengandung dua komponen utama yaitu EGCG 47,08% dan ECG 20,73%; fraksi 2 mengandung EGCG 45,15% dan EGC

19,20%. Fraksi 3 mengandung senyawa EGCG 43,95%, sedangkan fraksi 4 didominasi oleh C 66,19% dan EGCG hanya 19,72%. Fraksi 6 diperoleh C 73,19% dan GC 14,86%. Fraksi 5, 7 dan 8 tidak dianalisis menggunakan KCKT mengingat rendemen ekstrak yang diperoleh sangat sedikit.

Fraksionasi menggunakan pelarut kloroform-metanol-air (65:35:10 v/v/v) menghasilkan 6 fraksi utama, dimana fraksi 1, 2 dan 3 didominasi oleh dua komponen utama berupa EGCG dengan kandungan masing-masing sebesar 44,61%; 46,12%; dan 44,84% serta ECG masing-masing sebesar 20,21%; 21,02%; dan 19,94%. Fraksi 4 mengandung EGCG 40,24% dan C 17,30%, fraksi 5 mengandung C 40,86% dan EGCG 29,28%. Sedangkan fraksi 6 didominasi oleh C 78,82% dan EC 12,71%.

Hasil analisis individual katekin dari berbagai kombinasi pelarut yang dicoba menunjukkan bahwa elusi dengan menggunakan etil asetat-etanol bergradien menghasilkan fraksi EGCG yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lainnya. Oleh karena itu eluen ini akan digunakan untuk elusi tahap selanjutnya. Eluat yang diperoleh dari kelompok fraksi 1-3 dipekatkan untuk selanjutnya dielusi lebih lanjut menggunakan etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v) secara gradien. Hasil analisis perolehan EGCG dari fraksionasi tahap 2 menggunakan eluen etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v) secara bergradien dapat dilihat pada Gambar 5.

Gambar 5 diatas menunjukkan bahwa sebanyak 4 fraksi utama telah diperoleh dari elusi ini. Fraksi 1-3 mengandung dua komponen utama berupa EGCG dengan kandungan masing-masing fraksi sebesar 64,03%; 56,44%; dan 53,93% serta ECG 20,66%; 18,35%; dan 16,73%. Fraksi 4 mengandung EGC 22,51% dan EGCG 35,88%. Fraksi 5-8 tidak dianalisis menggunakan KCKT mengingat hasil yang diperoleh sangat sedikit.

EGCG dan ECG banyak terelusi diawal fraksi, sedang 4 komponen lainnya lebih cenderung terelusi diakhir fraksi. Hal

ini disebabkan sifat kedua senyawa tersebut yang relatif agak non polar dibanding dengan senyawa katekin lainnya. Di samping itu EGCG dan ECG yang merupakan senyawa ester galat relatif lebih kuat larut dalam etil asetat.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil pengamatan dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Hasil optimal dari proses ekstraksi adalah menggunakan pelarut aseton-air (70:30 v/v), rasio teh/pelarut 1 : 15 b/v, selama 15 menit pada suhu 55-60 °C diperoleh kadar total polifenol 53.30% b/b dalam ekstrak dan rendemen ekstrak 40,17% b/b.
2. Proses fraksionasi dua kali elusi menggunakan fase diam silika gel dan eluen etil asetat-etanol 90% (1:1 v/v) secara gradien menghasilkan ekstrak berkadar total katekin hingga 94% b/b dengan EGCG 64,03% b/b dari umpan berkadar total katekin 82,96% b/b dengan EGCG 42,29% b/b.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz, R., Shaidi, F., and Wiczowski, W. 2003. Separation of individual catechin from green tea using silica gel column chromatography and HPLC. *Journal of Food Lipid*. 10 (2), p 165-177
- Atoui.A.K., Mansouri. A., Boskou. G. and Epalas. P. 2005. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem*. 89: 27-36

- Anderson, A. R. and Polansky, M. 2002. Tea Enhances Insulin Activity: *J. Agric. Food Chem.* 50, 7182-7186
- Burdick, and Carl, D. 2001. Process for the production of epigallocatechin gallate. *European Patent* (EP 1 077 211 A2).
- Cabrera. G.: Gimenez. R.: Lopez. M.C 2003. Determination of tea component with antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4427-4435.
- Chen R.L.C.: Lin. C.H.: Chung, C.Y.: Cheng, T.J. 2005. Determination of tea tannin in green tea infusion by flow-injection analysis based on quenching the fluorescence of 3-aminophthalate. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 8443-8446.
- Daykin, C.A.: Van Duynhoven, J.P.M.: Gronewegen, A.: Dachtler, M.: Van Amelsvoort, J.M.M.: Mulder, T.P.J. 2005. Nuclear magnetic resonance spectroscopic based studies of the metabolism of black tea polyphenols in humans. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1428-1434.
- Dorstern, F.A.V., Daykin, C.A., Mulder, T.P., and Duynhoven. 2006, Metabolismic approach to determine metabolic differences between green tea and black tea consumption. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6929-6938.
- Druzynska, B., Stepniewska, A., Wolosiak, R. 2007. The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extract. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment* (6) 2007, p 27-36.
- Hara, Y. 2008. Development of tea catechin into pharmaceuticals. *Proceeding of the 3rd International conference on O-CHA (Tea) Culture and Science*, Shizuoka, Japan
- Rohdiana, D., dan Shabri. 2007. Separasi katekin menggunakan membran filtrasi. *Pros. Seminar Nasional Rekayasa Kimia dan Proses 2007*. Teknik Kimia Fakultas Teknik UNDIP, Semarang.
- Yoshida. Y., Kiso, M., and Goto. T. 1999. Efficiency of the extraction of catechin from green tea. *Food Chemistry* 67: 429-433.
- Zhang, S.Q., and Matsuura, T. 1991. Application of membrane separation processes for the concentration of green tea juice. *Proceeding of the International symposium of tea science*. August 26-29, 1991. Shizuoka, Japan.