

Effects of vitamin C and E on the stability of epigallocatechin gallate (EGCG) in the ethyl acetate fraction of green tea (*Camellia sinensis* L.) leaf

Efek vitamin C dan E terhadap stabilitas epigalokatekin galat (EGCG) pada fraksi etil asetat daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.)

Naniek Widyaningrum*, Titiek Sumarwati, Waode Sitti Sukryana

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Sultan Agung, Semarang

*Corresponding Author. Email: naniek@unissula.ac.id

Abstract

Background: Green tea leaves (*Camellia sinensis* L.) have the highest metabolite content, epigallocatechin gallate (EGCG). Naturally, this compound susceptible oxidizes and becomes unstable when stored. Therefore, it is necessary to add natural antioxidants, such as vitamin C and vitamin E.

Objective: To determine the effects of adding vitamin C, vitamin E, and a combination of both on the stability of EGCG in the ethyl acetate fraction of green tea leaves.

Method: Green tea leaf extract was put in decoction process at 90°C for 30 minutes. Extract was given vitamin C, vitamin E and a combination of both stored on day 0 and day 15 at 2°C. Then fractionation was using ethyl acetate. EGCG levels were tested using HPLC. Data analysis was using One Way Anova with a 95% confidence level.

Results: The ethyl acetate fraction of green tea leaf added with vitamin C produced higher EGCG levels than vitamin E, and combination of both vitamins significantly ($p < 0.05$).

Conclusion: Adding vitamin C and E could maintain the stability of EGCG content.

Keywords: *Camellia sinensis* L., EGCG, vitamin C, vitamin E, stability

Intisari

Latar belakang: Daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) memiliki kandungan metabolit epigalokatekin galat (EGCG) tertinggi. Senyawa ini rentan mengalami oksidasi sehingga tidak stabil ketika disimpan. Oleh karena itu, perlu ditambahkan dengan antioksidan alami, seperti vitamin C dan vitamin E.

Tujuan: Untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C, vitamin E dan kombinasi kedua vitamin terhadap stabilitas EGCG pada fraksi etil asetat daun teh hijau.

Metode: Simplisia daun teh hijau didekoktasi 90°C selama 30 menit. Hasil ekstraksi diberi vitamin C, vitamin E dan kombinasi keduanya yang disimpan pada hari ke-0 dan hari ke-15 pada suhu 2°C. Kemudian fraksinasi dilakukan menggunakan etil asetat. Pengujian kadar EGCG menggunakan HPLC. Analisis data menggunakan *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil: Fraksi etil asetat daun teh hijau yang ditambah vitamin C dapat menghasilkan kadar EGCG lebih tinggi dibanding vitamin E dan kombinasi vitamin C dan vitamin E secara signifikan ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Penambahan vitamin C dan E mampu menjaga stabilitas kandungan EGCG.

Kata kunci: *Camellia sinensis* L., EGCG, vitamin C, vitamin E, Stabilitas

1. Pendahuluan

Teh hijau (*Camellia sinensis* L.) mengandung metabolit sekunder *catechin* dengan *epigallocatechin gallate* (EGCG) sebagai kandungan utama (36%). Komponen lain yang terkandung, antara lain *epigallocatechin* (24%), *epicatechin* (13%), *gallocatechin* (4%), *gallocatechin gallate* (1%), dan *epicatechin gallate* (1,8%) (Tiwari, *et al.*, 2011). EGCG diketahui mempunyai beberapa manfaat, seperti sebagai antioksidan, antimikroba, dan antiakne. Metabolit ini rentan sekali mengalami oksidasi sehingga tidak stabil saat disimpan. Berdasarkan

studi oleh Bianchi, *et al.* (2011), EGCG akan mengalami penurunan kadar hingga 85% ketika terkena sinar radiasi selama 1 jam. Widyaningrum, *et al.*, (2015) menyatakan bahwa EGCG dapat stabil saat disimpan pada suhu 2°C serta saat ditambahkan *buffer solution* dengan pH 4. Selain itu, menurut Hirun & Roach (2011), EGCG dapat stabil jika berada dalam lingkungan asam. Reaksi oksidasi EGCG terjadi karena adanya polimerasi senyawa fenolik dan stres oksidasi (Tan, *et al.*, 2018). Stres oksidasi dapat dicegah dengan antioksidan. Vitamin C dan E merupakan contoh antioksidan alami yang bersifat asam sehingga diharapkan mampu mengikat radikal bebas yang terbentuk ketika terjadi proses oksidasi dan mencegah terjadinya kerusakan EGCG (Sugihartini, *et al.*, 2016). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dan E terhadap kestabilan EGCG pada fraksi etil asetat daun teh hijau.

2. Metodologi Penelitian

2.1. Alat dan bahan

Sampel yang digunakan berupa daun teh hijau sebanyak 5 kg yang diperoleh dari PT. Sari Kemuning Karanganyar Jawa Tengah. Bahan lain yang digunakan yaitu vitamin C (*Sigma-Aldrich*), vitamin E (*Sigma-Aldrich*), larutan dapar pH 4, asam fosfat 0,1% (*Sigma-Aldrich*), metanol (*Sigma-Aldrich*), asetonitril (*Sigma-Aldrich*), trietanolamin (*Merck*), dan aquadest. Alat yang digunakan adalah termometer, *rotary evaporator*, pH meter (*Pyrex*), corong pisah (*Pyrex*), *High Performance Liquid Chromatography/HPLC* (*Shimadzu*).

2.2. Prosedur penelitian

2.2.1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman yang akan digunakan berdasarkan ciri fisiologinya seperti daun, bunga, batang serta akar. Determinasi tanaman yang digunakan mengacu pada *Flora of Java*.

Fraksinasi dengan menggunakan etil asetat

Daun teh hijau dibersihkan, dicuci kemudian dikeringkan dalam lemari pengering simplisia pada suhu 40°C kurang lebih 3-4 hari. Enam puluh gram simplisia daun teh hijau didekoktasi pada suhu 90°C selama 30 menit dengan 1200 mL air suling. Hasil ekstrak kemudian disaring dan didinginkan hingga suhu ekstrak 5°C. Lalu ekstrak diberi tetesan *buffer solution* pH 4 sebagai kontrol positif (+), diberi perlakuan berupa vitamin C hingga pH 4, vitamin E hingga pH 4, atau kombinasi antara vitamin C dan vitamin E hingga pH 4 serta tanpa penambahan senyawa lain sebagai kontrol negatif (-). Ekstrak disimpan pada suhu 2°C untuk diujikan pada hari ke 0 dan hari ke 15. Filtrat difraksinasi dengan 1200 mL etil asetat dan dikentalkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental yang kemudian diuji dengan *moisture balance* (kadar air < 2%) (Widyaningrum, *et al.*, 2015).

Pengukuran hasil rendemen ekstrak menggunakan rumus berikut.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat serbuk daun teh hijau}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.2. Spesifikasi kadar EGCG dengan menggunakan HPLC

Spesifikasi fraksi etil asetat ekstrak teh hijau dilakukan berdasarkan EGCG. Digunakan sistem HPLC dari metode hasil penelitian Martono & Martono (2013) yaitu dengan fase terbalik dengan sistem elusi isokratik.

2.2.2.1. Pembuatan fase gerak sistem HPLC

Fase gerak yang digunakan adalah campuran asam fosfat 0,1%: metanol: asetonitril: air suling dengan perbandingan 14:1:3:7 (v/v/v/v). Air suling yang digunakan sebelumnya disaring dengan membran filter 0,45 μ setelah keempatnya dicampur kemudian ditambahkan trietanolamin sampai diperoleh pH larutan 4.

2.2.2.2. Pembuatan larutan induk EGCG

EGCG ditimbang sebesar 25 mg yang kemudian dilarutkan dalam fase gerak 25 mL. Larutan induk ini kemudian digunakan untuk uji linieritas, keberulangan, presisi dan uji kesesuaian sistem.

2.2.2.3. Kondisi HPLC untuk penetapan kadar EGCG

Kondisi yang digunakan dalam penetapan kadar EGCG adalah sampel diinjeksikan dengan volume injeksi 20 μ L, yang kemudian dielusi dengan menggunakan fase diam C 18. Fase gerak yang digunakan menggunakan kecepatan alir 1,2 mL/menit dan dideteksi dengan detektor spektrofotometer UV pada (λ) 280 nm (Martono & Martono, 2013).

Analisis Data

Dari data yang diperoleh di uji normalitas dan homogenitas menggunakan *Shapiro wilk* dan *Levene Test*. Data menunjukkan normal dan homogen ($p > 0,05$) sehingga dilakukan uji *Oneway Anova*. Pada uji *Oneway Anova* terdapat perbedaan yang signifikan sehingga dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*.

3. Hasil dan pembahasan

Determinasi tanaman yang dilakukan bertujuan memastikan kebenaran tanaman yang digunakan. Hasil yang didapatkan teh yang berasal dari PT. Sari Kemuning Karanganyar Jawa Tengah termasuk dalam spesies *Camellia sinensis* L.

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode dekotisasi menggunakan pelarut aquadest untuk menyari senyawa aktif EGCG yang terkandung dalam daun teh hijau. Setelah dekotisasi, ekstrak didinginkan hingga suhu 2^oC selama 30 menit agar kadar EGCG dalam daun teh hijau meningkat. Pada perlakuan tersebut, terjadi perubahan warna ekstrak dari coklat pekat menjadi kuning. Hal ini diduga akibat terjadinya pencegahan polimerisasi senyawa fenolik

(Widyaningrum, *et al.*, 2017). Masing-masing ekstrak diberikan senyawa hingga pH 4 karena diketahui EGCG stabil pada larutan yang bersifat asam dan stabil pada suhu 2⁰C yang disimpan selama 15 hari (Hirun & Roach, 2011). Stabilitas EGCG dilakukan dengan penambahan vitamin C sebesar 7,5 gram sehingga menghasilkan pH 4. Vitamin E diketahui bersifat netral yang memiliki pH 7 dan larut dalam lemak. Namun pada kelompok vitamin E, ekstrak ditambahkan dengan 1 mL HCl pekat untuk mengkondisikan pH menjadi 4 karena sifat EGCG stabil pada kondisi asam dan vitamin E dapat terdispersi dalam ekstrak. Penambahan kombinasi vitamin C dan vitamin E hingga pH 4 digunakan perbandingan 1:1 yaitu 7,5 gram vitamin C dan 7,5 gram vitamin E. Kontrol positif digunakan buffer solution pH 4 karena diketahui dapat menstabilkan kadar EGCG (Widyaningrum, *et al.*, 2017).

Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa yang akan diambil. Fraksinasi dilakukan menggunakan etil asetat agar turunan katekin yang terdapat didalam daun teh hijau dapat larut dalam asetil asetat yang sifatnya semi polar. Aquadest yang bersifat polar dapat mengambil senyawa karbohidrat dan protein yang juga bersifat polar. Setelah itu, dilakukan evaporasi untuk menghilangkan pelarutnya dan yang tersisa hanyalah senyawa turunan katekin. Pemekatan dilakukan menggunakan rotari evaporator pada suhu 50°C dengan kecepatan 120rpm.

Tabel 1. Hasil pengukuran kadar EGCG pada fraksi etil asetat ekstrak daun teh hijau dengan diberi perlakuan pada hari ke-0 dan hari ke-15

Perlakuan	Hari ke-0 (%w/w)	Rata-rata (%w/w)	Hari ke-15 (%w/w)	Rata-rata (%w/w)	Keterangan
Vitamin C	20,79	19,50	23,63	23,82	Meningkat
	18,21		24,01		
	19,50		23,82		
Vitamin E	20,90	19,04	23,68	23,56	Meningkat
	17,19		23,45		
	19,04		23,56		
Kombinasi	14,08	13,08	16,45	15,98	Meningkat
	12,08		15,47		
	13,08		15,98		
Kontrol (+)	22,15	21,73	29,47	29,04	Meningkat
	21,32		28,62		
	21,73		29,04		
Kontrol (-)	13,98	15,56	11,45	13,65	Menurun
	19,14		15,85		
	15,56		13,65		

Spesifikasi kadar EGCG dilakukan pengujian menggunakan metode HPLC untuk melihat besar kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam serbuk fraksi. Hasil pengukuran kadar EGCG yang disimpan pada hari ke-0 dan hari ke-15 disajikan pada tabel 1. Kadar EGCG pada ekstrak dengan penambahan vitamin C hingga pH 4 yang disimpan pada hari ke-0 yaitu 19,50%w/w sedangkan kadar EGCG yang disimpan pada hari ke-15 sebesar 23,82%w/w. Hal

ini terjadi karena vitamin C bersifat polar, larut dalam air dan vitamin C juga sebagai antioksidan yang berada dalam fase yang sama dengan EGCG yaitu fase air sehingga EGCG dapat terlindung oleh pengaruh oksidasi karena keberadaan vitamin C.

Kadar EGCG dengan penambahan vitamin E hingga pH 4 pada hari ke-0 yaitu 19,04 %w/w sedangkan kadar yang disimpan pada hari ke-15 yaitu 23,56%w/w. Peningkatan kadar EGCG tidak terlalu tinggi dibanding vitamin C karena sifat vitamin E relatif nonpolar dan berbeda fase dengan EGCG. Disamping itu, vitamin E juga memiliki sifat mudah mengalami fotolisis atau pelisisan senyawa kimia dengan bantuan sinar (Tiburcio-Moreno, *et al.*, 2012). Penelitian ini didukung oleh Sugihartini, *et al.* (2016) tentang stabilitas EGCG dalam krim ekstrak teh hijau dengan variasi konsentrasi antioksidan vitamin C 1% dan vitamin E 1%. Dengan penambahan vitamin C 1%, kadar EGCG lebih tinggi dibandingkan dengan krim ekstrak daun teh hijau yang ditambahkan dengan vitamin E 1%.

Kadar EGCG dengan penambahan kombinasi vitamin C dan vitamin E hingga pH 4 yang disimpan pada hari ke-0 yaitu sebesar 13,08 %w/w sedangkan kadar EGCG yang disimpan pada hari ke-15 yaitu 15,98 %w/w. Hal ini menunjukkan terjadi peningkatan kadar EGCG ketika disimpan pada hari ke-15 namun memiliki kadar yang lebih rendah. Kadar EGCG tertinggi diperoleh dari kelompok perlakuan yang diberikan vitamin C hingga pH 4. Hal ini didukung oleh penelitian bahwa EGCG stabil ketika disimpan pada suhu 2^oC selama 15 hari dan stabil pada larutan yang bersifat asam (Hirun & Roach, 2011).

Senyawa EGCG yang terdapat didalam daun teh hijau diketahui mudah mengalami oksidasi. Vitamin C dan E sebagai antioksidan alami dapat mencegah terjadinya oksidasi pada suatu senyawa. Pada uji *Oneway anova* menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kadar EGCG yang ditambah vitamin C, vitamin E dan kontrol (+) ketika disimpan pada hari ke-15. Hal ini menunjukkan kadar EGCG stabil selama penyimpanan. Pada kontrol (-) dan kombinasi vitamin C dan vitamin E ketika disimpan pada hari ke-15 tidak terdapat perbedaan yang signifikan atau hasil yang diperoleh tidak stabil dan memiliki kadar EGCG yang rendah. Hal ini dimungkinkan adanya interaksi antara vitamin C dan vitamin E. Menurut penelitian Rukmiasih, *et al.*, (2010) tentang penggunaan beluntas, vitamin C dan vitamin E sebagai antioksidan untuk menurunkan *off-odor* (25%) yang mana ketika dikombinasikan maka akan menyebabkan vitamin C tidak memiliki kesempatan membentuk senyawa dengan Fe⁺⁺ atau prooksidan tetapi lebih banyak berfungsi untuk memperbaharui vitamin E. Hal ini menyebabkan tujuan penggunaan kombinasi vitamin C dan vitamin E untuk melindungi asam lemak tidak jenuh yang mudah mengalami oksidasi tidak tercapai bahkan sebaliknya lebih banyak teroksidasi sehingga kadarnya rendah. Oleh karena itu dari hasil penelitian ketika dikombinasikan vitamin C dan vitamin E yang disimpan pada hari ke-0 dan hari ke-15 terjadi penurunan kadar EGCG atau memiliki kadar EGCG yang rendah dan tidak stabil.

4. Kesimpulan

Penambahan vitamin C dan vitamin E dapat menstabilkan kandungan *Epigallocatechin gallate* (EGCG).

Daftar pustaka

- Bianchi, A., Marchetti, N., & Scalia, S. (2011). Photodegradation of (-)-epigallocatechin-3-gallate in topical cream formulations and its photostabilization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(4), 692–697.
- Hirun, S., & Roach, P. D. (2011). An improved solvent extraction method for the analysis of catechins and caffeine in green tea. *Journal of Food and Nutrition Research*, 50(3), 160–166.
- Martono, Y., & Martono, S. (2013). Analisis kromatografi cair kinerja tinggi untuk penetapan kadar asam galat, kafein dan epigalokatekin galat pada beberapa produk teh celup. *Agritech*, 32(04), 362–369.
- Rukmiasih, PS, H., PP, K., & PR, M. (2010). Penggunaan beluntas, vitamin C dan E sebagai antioksidan untuk menurunkan off-odor (25%) daging itik Alabio dan Cihateup. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 15(2), 101–109.
- Sugihartini, N., Susanti, H., Zaenab, Hanifah, H., & Marlina, S. A. (2016). Stability of epigallocatekin galat in green tea extract cream with variation of antioxicide vitamin C 1% and vitamin E 1%. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 13(2), 52–56.
- Tan, B. L., Norhaizan, M. E., Liew, W. P. P., & Rahman, H. S. (2018). Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9(OCT), 1–28.
- Tiburcio-Moreno, J. A., Marcelín-Jiménez, G., Leanos-Castaneda, O. L., Yanez-Limon, J. M., & Alvarado-Gil, J. J. (2012). Study of the photodegradation process of vitamin e acetate by optical absorption, fluorescence, and thermal lens spectroscopy. *International Journal of Thermophysics*, 33(10–11), 2062–2068.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutic Scientia*, 1(1), 98–106.
- Widyaningrum, N., Fudholi, A., Sudarsono, & Setyowati, E. P. (2015). Stability of Epigallocatechin Gallate (EGCG) from Green Tea (*Camellia sinensis*) and its Antibacterial Activity against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Propionibacterium acnes* ATCC 6919. *Asian Journal of Biological Sciences*, 8(2), 93–101.