

Analisis Kadar Asam Askorbat dan Asam Benzoat dalam Minuman Ringan dengan HPLC Menggunakan Fasa Gerak Metanol dan Buffer Asetat

Rani Sanjaya¹, Budhi Oktavia², Bahrizal³

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang

¹sanjaya_rani@rocketmail.com, ²budhi_okt@yahoo.com, ³bahrizal_kimiaunp@yahoo.com

Abstrak - Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum untuk pemisahan dan penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat yang berperan sebagai pengawet dalam minuman ringan yang beredar di pasaran dan di lingkungan sekolah dengan menggunakan HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum HPLC yang menggunakan fasa gerak metanol dan buffer asetat berada pada laju alir 1 ml/mnt, Kolom ODS C₁₈, $\lambda = 240$ nm, pH buffer 3.5, dilakukan secara elusi gradien yang dimulai pada komposisi fasa gerak 5:95 hingga 50:50 selama 5 menit. Dari hasil uji kadar sampel minuman ringan yang dijual di lingkungan sekolah tidak ditemukan asam askorbat dan asam benzoat sebagai bahan pengawet, sedangkan untuk minuman ringan yang beredar di pasaran dari 5 sampel yang diuji ditemukan sampel yang mengandung asam benzoat yang melebihi batas maksimum yang diizinkan yang terdapat pada sampel C yaitu 676 ppm, sedangkan kadar yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk asam benzoat adalah 600 ppm, sedangkan untuk kandungan asam askorbat terbanyak terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm.

Kata Kunci - asam askorbat, asam benzoat, HPLC, methanol

I. PENDAHULUAN

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fasa gerak dan fasa diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan. Kromatografi yang banyak digunakan untuk fasa cair adalah HPLC. Karena analisa dengan HPLC cepat, daya pisah baik, persiapan sampel mudah dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai^[5]. HPLC dapat digunakan untuk penentuan zat-zat organik yang ada dalam minuman seperti asam askorbat dan asam benzoat.

Asam benzoat merupakan bahan pengawet yang dapat membebaskan makanan dan minuman dari mikroba pembusuk. Asam askorbat merupakan suatu antioksidan yang juga termasuk bahan pengawet, karena mampu mencegah bau tengik. Penggunaan asam benzoat dan asam askorbat sebagai pengawet dapat menimbulkan efek buruk terhadap kesehatan apabila kadar pemakaian bahan pengawet tidak diatur dan diawasi.

Beberapa metoda untuk penentuan vitamin C atau asam askorbat telah dilakukan, diantaranya yaitu dengan metoda titrasi menggunakan dikloroindofenol, namun metoda ini mempunyai kelemahan diantaranya bahan makanan yang mengandung senyawa-senyawa yang dapat mereduksi zat warna selain vitamin C, dan batas akhir titrasi yang tidak jelas, terutama adanya ekstrak yang mengandung pigmen^[1].

Penentuan kadar asam benzoat dengan metoda HPLC sebelumnya telah dilakukan dengan menggunakan fasa gerak metanol dan buffer fosfat secara elusi isokratik dan didapatkan

waktu retensi yang lama untuk asam benzoat^[10]. Berdasarkan latar belakang di atas, maka pada penelitian ini perlu dicari kondisi optimum pada penggunaan HPLC dalam menentukan kadar asam askorbat dan asam benzoat agar diperoleh hasil yang lebih baik. Pada penelitian ini kondisi optimum diperoleh dengan memvariasikan pH dan komposisi fasa gerak sehingga diperoleh pH dan komposisi fasa gerak optimum serta melakukan elusi gradien agar diperoleh waktu retensi yang lebih pendek untuk asam benzoat.

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat: HPLC Agilent 1120 Compact LC dengan kolom C₁₈, spektrofotometer UV-Vis Agilent 8453, pH meter, neraca analitik, pengaduk ultrasonik, syringe filter dan alat-alat gelas.

Bahan: Bahan baku standar yaitu, asam askorbat, asam benzoat, metanol, buffer asetat, aquades, dan sampel minuman ringan

B. Cara Kerja

1) Sampling minuman

Sampel minuman ringan dipilih secara acak berdasarkan merek yang beredar di pasaran dan di lingkungan sekolah di kota Padang.

2) Pembuatan larutan baku Asam askorbat dan Asam benzoat

Larutan induk 1000 ppm asam benzoat, dan asam askorbat dibuat dengan cara, 100 mg masing-masingnya dilarutkan dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas.

3) Penentuan kondisi optimum untuk penentuan asam askorbat dan asam benzoat secara HPLC

a) Penentuan panjang gelombang optimum secara spektrofotometri UV

Larutan asam benzoat dan asam askorbat 50 ppm diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, kemudian dibuat kurva serapannya. Tentukan panjang gelombang optimum untuk analisis dimana kedua senyawa memberikan serapan yang baik.

b) Penentuan pH Buffer Asetat sebagai komponen fasa gerak

Campuran larutan asam benzoat dan asam askorbat diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam kolom HPLC dengan laju alir 1 mL/menit menggunakan fasa gerak campuran dari metanol dan buffer asetat pH 3.5, 4.5 dan 5.5 dengan komposisi metanol : buffer asetat (50:50) pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya. Kemudian ditentukan pH buffer asetat yang menghasilkan pemisahan paling baik.

c) Penentuan komposisi fasa gerak optimum

Campuran larutan yang mengandung asam benzoat dan asam askorbat diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam HPLC dengan kecepatan alir 1 ml/menit menggunakan variasi komposisi fasa gerak metanol dan buffer asetat 10:90, 30:70, 50:50 dan 70:30 pada kondisi panjang gelombang optimum dan pH optimum yang telah diperoleh sebelumnya. Lalu ditentukan komposisi fasa gerak yang menghasilkan pemisahan yang baik dan waktu retensi yang lebih pendek.

4) Pembuatan kurva kalibrasi dari larutan standar asam askorbat dan asam benzoat

Campuran larutan asam benzoat dan asam askorbat dengan variasi konsentrasi untuk asam askorbat 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm, dan variasi konsentrasi untuk asam benzoat 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm dan 125 ppm diinjeksikan sebanyak 20 μ L kedalam kolom HPLC menggunakan kondisi optimum analisa yang telah ditentukan sebelumnya. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan konsentrasi (ppm) dan luas puncak yang dihasilkan.

5) Penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat secara HPLC

Sebanyak 1 ml sampel minuman ringan dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan aquades sampai garis batas dan dihomogenkan. Sebanyak 20 μ L sampel diinjeksikan kedalam kolom HPLC menggunakan kondisi optimum analisis yang telah ditentukan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

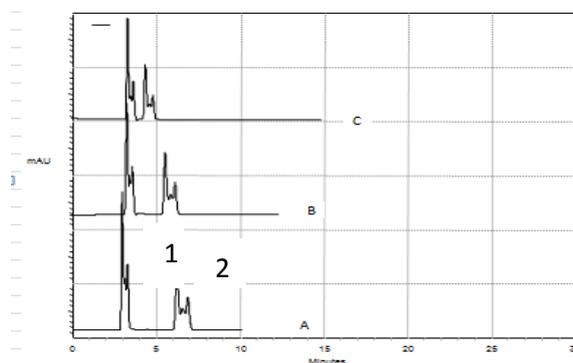
A. Penentuan Kondisi Optimum

1) Penentuan panjang gelombang optimum

Penentuan panjang gelombang optimum dari senyawa asam askorbat dan asam benzoat bertujuan untuk melihat pada panjang gelombang berapakah kedua senyawa tersebut dapat memberikan penyerapan yang baik sehingga pemisahan dengan HPLC dapat dilakukan. Dari hasil pengukuran diperoleh panjang gelombang maksimum asam askorbat adalah 245 nm, dan panjang gelombang maksimum untuk asam benzoat adalah 230 nm. Untuk itu pada penelitian ini digunakan panjang gelombang 240 nm, sehingga kedua senyawa masih dapat terdeteksi dan memberikan penyerapan yang baik.

2) Penentuan pH optimum buffer asetat sebagai komponen fasa gerak

Dari variasi pH buffer asetat yang digunakan didapatkan pH optimum pada pH 3.5. Pemilihan variasi pH dilakukan secara selektif agar tidak merusak kolom. Jika pH yang divariasikan terlalu rendah maka ikatan silika yang berfungsi sebagai fasa diam dapat putus (terhidrolisis), dan jika pH terlalu basa maka silika akan larut, karena silika larut dalam suasana basa, sehingga tidak akan diperoleh hasil pemisahan yang baik [2].

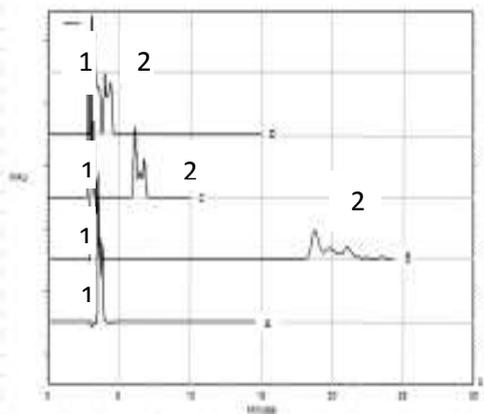


Gambar 1. Kromatogram penentuan pH optimum Laju alir 1 ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:bufferasetat (50:50)A; metanol:buffer asetat pH 3.5, B; metanol:buffer asetat pH 4.5, C; metanol :buffer asetat pH 5.5, 1) Asam askorbat, 2) Asam Benzoat.

3) Penentuan Komposisi Fasa Gerak Optimum

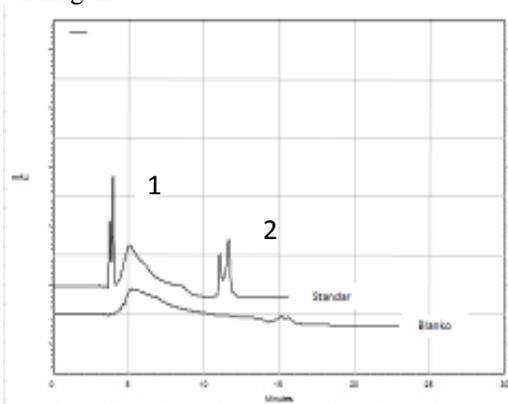
Dari gambar 1 diatas dapat dilihat komposisi fasa gerak 50:50 pada pH 3.5 telah terjadi pemisahan yang baik. Pada kondisi tersebut asam askorbat memberikan waktu retensi 2.93 hal ini bersamaan dengan munculnya *system peak*, yaitu puncak yang muncul meskipun tidak ada sampel yang diinjeksikan. Untuk menghindari *system peak* yang dapat

mengganggu puncak dari sampel, maka dilakukanlah variasi komposisi fasa gerak agar diperoleh pemisahan yang baik. Variasi komposisi fasa gerak dilakukan pada komposisi 10:90, 30:70, 50:50, dan 70:30. Dari hasil pengukuran pada berbagai komposisi fasa gerak dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kromatogram penentuan variasi komposisi fasa gerak Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:buffer asetat(3.5)A; metanol:buffer asetat (10:90), B; metanol:buffer asetat (30:70), C; metanol:buffer asetat (50:50), D; metanol :buffer asetat (70:30), 1) Asam askorbat, 2) Asam Benzoat

Dari kromatogram diatas dapat kita lihat bahwa asam askorbat pada komposisi fasa gerak 30:70, 50:50 dan 70:30 memberikan waktu retensi yang sama yaitu 2.9, sedangkan pada komposisi fasa gerak 10:90 asam askorbat muncul pada waktu retensi 3.45. Pada komposisi 10:90 asam benzoat muncul pada waktu retensi yang sangat lama, untuk memperpendek waktu retensi asam benzoat supaya didapatkan puncak dalam waktu sekitar 10 menit, maka dilakukan elusi gradien, yaitu perubahan komposisi fasa gerak selama elusi. Elusi gradien dimulai pada komposisi 5:95 hingga 50:50 selama 5 menit dan setelah terjadi elusi maka komposisi fasa gerak akan konstan pada 50:50, komposisi inilah yang digunakan sebagai komposisi optimum dari fasa gerak agar diperoleh pemisahan yang baik. Hasil pemisahan dengan kondisi ini dapat dilihat pada Gambar 8, yaitu waktu retensi untuk asam askorbat adalah 3.7 menit dan waktu retensi untuk asam benzoat adalah 11.6 menit. Kondisi ini dipakai untuk penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada sampel minuman ringan.

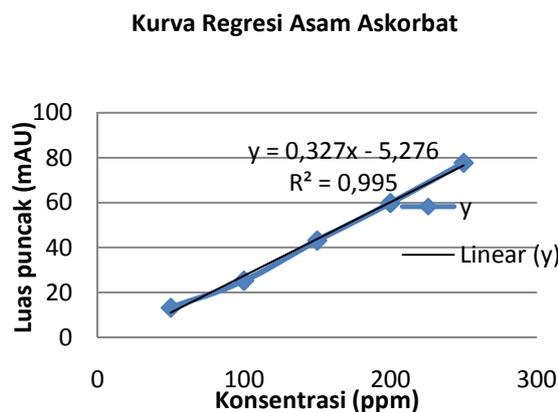


Gambar 8. Kromatogram Blanko dan Larutan Standar Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak methanol:buffer asetat (5:95), pH 3.5, 1) Asam askorbat, 2) Asam benzoat.

4) Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam askorbat dan AsamBenzoat

a) Kurva Kalibrasi Asam askorbat

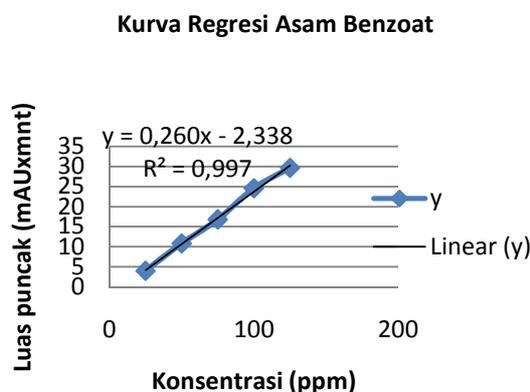
Berdasarkan kondisi optimum yang diperoleh dilakukan pengukuran larutan standar asam askorbat pada konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm dan diperoleh persamaan regresi linier seperti pada kurva berikut ini:



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Asam Askorbat Laju alir 1 ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak Metanol:Buffer Asetat(5:95), pH 3.5

b) Kurva Kalibrasi Asam benzoat

Berdasarkan kondisi optimum yang diperoleh dilakukan pengukuran larutan standar asam benzoat pada konsentrasi 25, 50, 75, 100, dan 125 ppm dan diperoleh persamaan regresi linier seperti kurva di bawah ini:



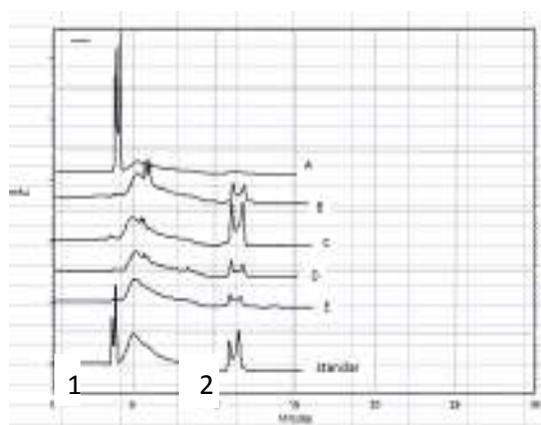
Gambar 4. Kurva Kalibrasi Asam Benzoat Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerakmetanol:Buffer Asetat (5:95), pH 3.5

5) Kromatogram analisis sampel

Telah dilakukan penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat berdasarkan kondisi optimum pengukuran larutan standar.

- a) Sampel yang dijual bebas di pasaran

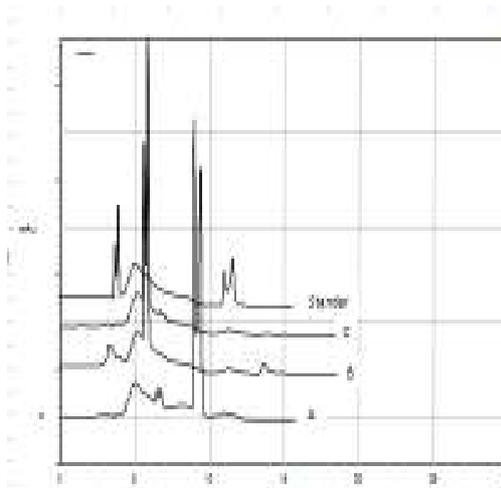
Gambar 5 menunjukkan kromatogram dari sampel yang dijual bebas di pasaran yang telah dianalisa menggunakan HPLC. Dari kromatogram dapat terlihat standar yang menggambarkan larutan standar asam askorbat dan asam benzoat, dan dari kromatogram dapat diketahui bahwa sampel A, C, dan D mengandung asam askorbat dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel A, yang ditandai dengan puncak sampel A merupakan puncak paling tinggi. Sampel B, C, D dan E mengandung asam benzoat sebagai pengawet dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel C.



Gambar 5. Kromatogram sampel minuman ringan yang dijual bebas di pasaran. Laju alir 1ml/mnt, λ=240 nm, Kolom ODS C₁₈, Fasa gerak metanol:buffer asetat (5:95), pH 3.5 , 1) Asam askorbat, 2) Asam benzoate

- b) Minuman ringan yang dijual di lingkungan sekolah

Gambar 6 merupakan kromatogram dari sampel minuman ringan yang dijual bebas di lingkungan sekolah yang telah dianalisa dengan HPLC. Dapat dilihat pada kromatogram standar yang merupakan standar larutan asam askorbat dan asam benzoat. Dari kromatogram dapat dilihat pada semua sampel tidak terdapat asam askorbat dan asam benzoat sebagai pengawet.



Gambar 6. Kromatogram Sampel Minuman Ringan yang dijual di sekolah Laju alir 1 ml/min, λ=240 nm, Kolom C₁₈, Fasa gerak metanol:buffer asetat (5:95), pH 3.5 , 1) Asam askorbat, 2) Asam benzoat

Setelah didapatkan kromatogram untuk sampel, maka dilakukan perhitungan luas puncak dari masing-masing komponen yaitu untuk asam askorbat dan asam benzoat. Dalam perhitungannya sampel diencerkan hingga 10 kali untuk memudahkan dalam analisa luas puncak karena konsentrasi asam askorbat dan asam benzoat dalam minuman ringan yang terlalu tinggi akan menyulitkan dalam analisa luas puncak.

B. Kadar asam askorbat dan asam benzoate secar HPLC

Dari kurva regresi linier dapat dihitung kadar asam askorbat dan asam benzoat di dalam kedua sampel, karena sampel diencerkan, maka perhitungan kadar telah dikalikan dengan faktor pengenceran.

1) Sampel yang dijual bebas di pasaran

TABEL 1
KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM BENZOAT DARI SAMPEL Laju alir 1 ml/mnt, μ=240 nm, kolom ODS C₁₈, fasa gerak methanol: buffer asetat (5:95), pH 3.5

Sampel	Asam Askorbat		Asam Benzoat	
	Luas Puncak (mAUxmnt)	Konsentrasi (ppm)	Luas puncak (mAUxmnt)	Konsentrasi (ppm)
A	88.55	2869	-	-
B	-	-	6.88	354
C	1.09	194	15.25	676
D	0.73	183	4.16	249
E	-	-	1.8	159

Dari tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa dari 5 sampel minuman ringan yang dijual bebas di pasaran, terdapat 3 sampel yang mengandung asam askorbat, dimana kadar tertinggi asam askorbat terdapat pada sampel A, yaitu 2869 ppm, sedangkan untuk asam benzoat terdapat 4 sampel yang mengandung asam benzoat sebagai pengawet, dimana kadar

tertinggi kandungan asam benzoatnya adalah pada sampel C yaitu 676 ppm.

2) Sampel yang dijual bebas di lingkungan sekolah

TABEL 2

KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM BENZOAT DARI SAMPEL
Laju alir 1 ml/mnt, $\lambda=240$ nm, kolom ODS C18, fasa gerak methanol: buffer
asetat (5:95), pH 3.5

No	Sampel	Asam askorbat	Asam benzoate
1	a	-	-
2	b	-	-
3	c	-	-

Dari tabel 2 di atas dapat dilihat bahwa dari 3 sampel minuman ringan yang dijual bebas di lingkungan sekolah yang dianalisa tidak terdapat asam askorbat maupun asam benzoat yang digunakan sebagai pengawet.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

- 1) Kondisi optimum pada penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada minuman ringan secara HPLC yaitu menggunakan kolom ODS C₁₈, laju alir 1 ml/mnt pada panjang gelombang 240 nm, pH buffer asetat 3.5 secara elusi gradien pada komposisi fasa gerak metanol:buffer asetat 5:95 dan akan konstan pada komposisi 50:50 pada waktu 5 menit.
- 2) Pada sampel minuman ringan yang dijual bebas di lingkungan sekolah tidak ditemukan asam askorbat

dan asam benzoat sebagai pengawet, sedangkan pada sampel minuman ringan yang dijual bebas dipasaran, asam benzoat ditemukan dalam empat sampel yaitu sampel B, C, D, dan E, dimana kadar tertinggi diperoleh pada sampel C yaitu 676 ppm yang melebihi batas maksimum yang diizinkan dalam pemakaian asam benzoat sebagai pengawet, dimana kadar yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk asam benzoat 600 ppm. Untuk asam askorbat ditemukan pada sampel A, C dan D. Dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Adnan Moehammad.1997. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis bahan makanan*. Yogyakarta: Andi.
- [2] Aman Sentosa Panggabean dkk, 2011. *Optimasi Kinerja Analitik Pada Penentuan Kafein dengan Metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Samarinda: Kimia FMIPA Unmul.
- [3] Hayun, Yahdiana, & Citra, 2004. *Penetapan Kadar Sakarin, Asam Benzoat, Asam Sorbat, Kafeina, dan Aspartam di Dalam Minuman Ringan Bersoda Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Jakarta: Farmasi FMIPA UI.
- [4] Johnson dan Stevenson, 1991. *Dasar Kromatografi Cair*, Terjemahan K. Padmawinata. Bandung: ITB.
- [5] Weiss, Joachim, *Ion Chromatography*, 2 ed. 1995
- [6] Putra Effendy, 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi* : Fmipa USU.
- [7] R.A Day dan A.L Underwood. A.L, 1998. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- [8] Sakidja M.S, 1989. *Kimia Pangan*. Jakarta : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan
- [9] Sunita Almatsier. 2004. *Prinsip dasar ilmu gizi*: Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- [10] Yandra Arief, 2011. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dengan Fasa Gerak Metanol dan Buffer Fosfat Untuk Penentuan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein*. Padang: Universitas Andalas.