

Analisis Kadar Kafein dan Sakarin pada Minuman Ringan dengan Fasa Gerak Metanol-Buffer Asetat Menggunakan HPLC

Reviana Ervita¹, Budhi Oktavia², Desy Kurniawati³

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang

¹reviana_ervita@yahoo.com, ²budhi_okt@yahoo.com, ³desy_kimiaunp22@yahoo.com

Abstrak - Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar kafein dan sakarin menggunakan metode HPLC detektor UV-Vis, metanol-buffer asetat digunakan sebagai fasa gerak dan kolom ODS C18 sebagai fasa diam. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan kondisi optimum untuk penentuan kafein dan sakarin dengan fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70) adalah pada pH 5,0 pada panjang gelombang (λ_{maks}) 270 nm. Sakarin dan kafein memberikan waktu retensi secara berturut-turut 4,35 menit dan 8,42 menit. Sampel diberi kode sesuai dengan huruf alfabet yaitu: A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan J. Kadar kafein tertinggi terdapat pada sampel berkode E dengan konsentrasi 383,62 ppm dan kadar sakarin tertinggi terdapat pada sampel G dengan konsentrasi 1551,23 ppm.

Kata kunci - kafein, sakarin, metanol, HPLC.

I. PENDAHULUAN

Kafein adalah salah satu jenis alkaloid yang banyak terdapat di daun teh (*Camellia sinensis*), biji kopi (*Coffea arabica*), dan biji coklat (*Theobroma cacao*). Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus, dan stimulasi otot jantung [1]. Berdasarkan efek farmakologis tersebut seringkali kafein ditambahkan dalam jumlah tertentu ke minuman suplemen. Efek samping dari penggunaan kafein secara berlebihan dapat menyebabkan gugup, gelisah, tremor, insomnia, hiperestesia, mual, dan kejang [2].

Selain kafein, sakarin juga merupakan zat kimia yang banyak digunakan dalam industri makanan dan minuman. Sakarin adalah zat pemanis buatan dari garam natrium dan asam. Sakarin berbentuk bubuk kristal putih, tidak berbau dan sangat manis. Pemanis buatan ini mempunyai tingkat kemanisan 500 kali gula biasa. Oleh karena itu sangat populer dipakai sebagai bahan pengganti gula. Penggunaan kafein dan sakarin dalam industri makanan dan minuman saat ini sangat mungkin digunakan karena mudah mendapatkannya. Namun penggunaan yang berlebihan dalam minuman dapat menyebabkan efek buruk pada manusia.

Penentuan kadar kafein dan sakarin menggunakan kromatografi merupakan teknik yang berkembang di kimia analitik. Beberapa penelitian menggunakan HPLC telah dilaporkan oleh J.W. Weyland, dkk (1982) [3], Qing-Chuan Chen dan Jin Wang (2001) [4], C.M. Lino and A. Pena (2010) [5], Arief Yandra (2011) [6].

Berdasarkan latar belakang diatas, maka pada penelitian ini akan dilakukan analisis kadar terhadap bahan tambahan yang terdapat dalam minuman ringan, yaitu sakarin sebagai pemanis buatan dan kafein sebagai pemberi efek stimulan menggunakan metode *High Performance Liquid*

Chromatography (HPLC). Penggunaan HPLC pada penentuan kafein dan sakarin ini sangat tepat karena analisis dengan HPLC cepat, daya pisah baik, peka, penyiapan sampel mudah, dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai [7].

II. METODE PENELITIAN

A. Alat dan Bahan

Alat: HPLC Agilent 1120 Compact LC, Spektrofotometer UV-Vis Agilent 8453, peralatan gelas, pH meter, syringe filter, neraca analitik, botol reagen, labu ukur, botol semprot, batang pengaduk, pipet tetes.

Bahan: kafein standar, sakarin standar, buffer asetat, metanol, aquades dan sampel berupa minuman ringan.

B. Cara Kerja

1) Prosedur kerja secara umum penggunaan HPLC

Prosedur kerja secara umum penggunaan HPLC adalah panjang gelombang (λ_{maks}) ditentukan terlebih dahulu menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Fasa gerak dialirkan dengan kecepatan alir 1 ml/menit sehingga didapatkan *base line* yang stabil. Setelah itu diinjeksikan blanko terlebih dahulu kemudian baru diinjeksikan sampel dan diperoleh data berupa kromatogram.

2) Sampling minuman

Proses sampling minuman ringan dilakukan berdasarkan merek yang beredar di pasaran dan di lingkungan sekolah di kota Padang.

3) Pembuatan larutan baku kafein dan sakarin

Dibuat larutan standar dari masing-masing bahan baku pembandingan dengan kadar 500 ppm dengan cara menimbang 0,5 gram bubuk kafein dan 0,5 gram sakarin, masing-masing

dilartukan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 1000 ml. Kemudian dibuat larutan standar 50 ppm.

4) Penetapan panjang gelombang pengukuran

Masing-masing larutan bahan baku pembanding tersebut diukur serapannya pada λ 200-700 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, lalu dibuat kurva serapannya. Kemudian ditentukan λ_{maks} untuk analisis.

5) Penentuan kondisi optimum untuk penentuan kafein dan sakarin secara HPLC

a) Variasi pH buffer asetat

Larutan campuran bahan baku pembanding kafein dan sakarin di dalam pelarut aquades, diinjeksikan sebanyak 20 μ l ke dalam kolom menggunakan fasa gerak campuran metanol dan air dengan buffer asetat pH 3,5 ; 4,0 ; 4,5 ; 5,0 ; 5,5 dengan perbandingan komposisi fasa gerak 50:50. Dipilih pH yang memberikan pemisahan terbaik berdasarkan waktu retensi (t_R) dan luas puncak.

b) Variasi fasa gerak

Larutan campuran bahan baku pembanding kafein dan sakarin di dalam pelarut aquades, diinjeksikan sebanyak 20 μ l ke dalam kolom menggunakan fasa gerak campuran metanol dan buffer asetat dengan variasi 90:10 ; 70:30 ; 50:50 ; 30:70 ; 10:90 dan buffer asetat pada pH optimum. Dipilih komposisi fasa gerak yang memberikan pemisahan terbaik berdasarkan waktu retensi (t_R) dan luas puncak

6) Penentuan kurva regresi linear dari larutan standar kafein dan sakarin

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

7) Penentuan kadar kafein dan sakarin secara HPLC

Kondisi terpilih kemudian digunakan pada analisis sampel. Menggunakan kondisi terpilih, 20 μ l sampel diinjeksikan kedalam kolom dan dicatat waktu tambat puncak-puncak yang dihasilkan sampel. Jika puncak-puncak tersebut mempunyai waktu tambat yang kurang lebih sama dengan waktu tambat puncak bahan baku pembanding, maka dapat disimpulkan bahwa pada sampel terdapat zat-zat tersebut.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Sampling Minuman Ringan (Soft Drink)

Telah dilakukan sampling terhadap 5 jenis merk minuman ringan yang dijual bebas dipasaran dan 5 jenis merk minuman ringan yang dijual di Lingkungan sekolah. Minuman tersebut dapat dibagi atas 3 kelompok, yaitu minuman berkarbonasi, minuman suplemen dan minuman teh dalam kemasan. Untuk kerahasiaan data, maka merk minuman tersebut telah disamarkan dan diganti dengan kode secara alphabet, yaitu A, B, C, D, E untuk minuman ringan yang dijual bebas dipasaran

dan F, G, H, I, J untuk minuman ringan yang dijual bebas di Lingkungan Sekolah.

Dalam penentuan kafein dan sakarin, analisa kualitatif dilakukan berdasarkan waktu retensi dan analisa kuantitatif berdasarkan luas puncak. Untuk kemudahan dalam analisis, beberapa sampel minuman telah diencerkan hingga 10 kali.

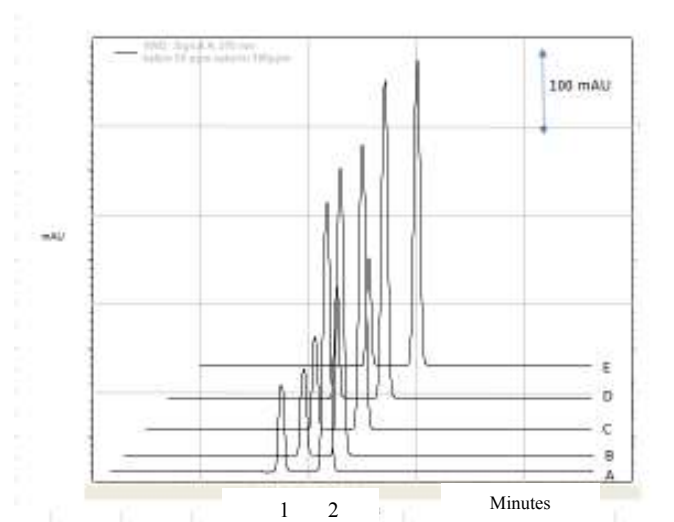
B. Panjang Gelombang Pengukuran

Panjang gelombang pengukuran untuk pengukuran kadar sakarin dan kafein dilakukan terlebih dahulu menggunakan alat Spektrofotometer UV-Vis. Hasil yang didapatkan adalah panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) untuk kafein adalah 271 nm dan untuk sakarin adalah 269 nm. Pada pengukuran dengan HPLC digunakan panjang gelombang 270 nm untuk kedua sampel tersebut. Pengukuran pada panjang gelombang 270 nm dilakukan dengan alasan bahwa pada panjang gelombang 270 nm tersebut, kafein dan sakarin masih dapat terdeteksi sekaligus untuk menghemat waktu analisis.

C. Kondisi optimum untuk penentuan kafein dan sakarin secara HPLC

1) Variasi pH buffer Asetat

Dari variasi pH buffer asetat yang digunakan, didapatkan pH optimum penentuan kafein adalah Metanol : Buffer asetat pada pH 5,0. Pemilihan pH optimum ini berdasarkan pada luas puncak yang dihasilkan dari masing-masing variasi pH tersebut. Pada fasa gerak metanol-buffer asetat pH 5,0 menghasilkan puncak yang paling luas. Larutan buffer berfungsi untuk mengontrol perbedaan pH yang disebabkan oleh matriks sampel atau dapat juga berperan sebagai penstabil medium penyangga. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada kromatogram berikut ini:

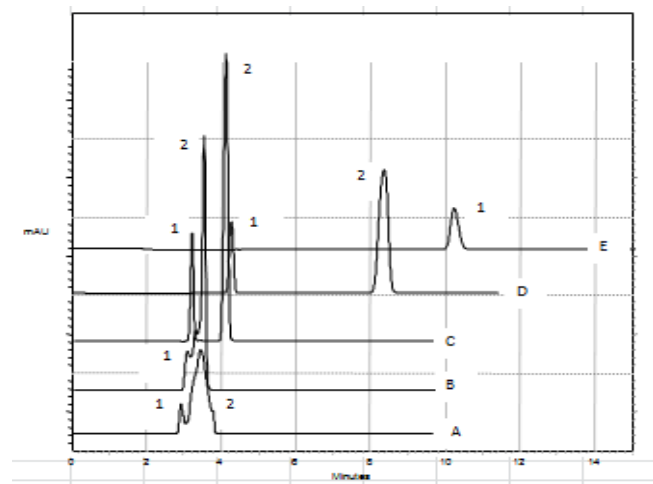


Gambar 1. Variasi pH

Laju alir 1 ml/menit, $\lambda = 270$ nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (50:50). A; metanol:buffer asetat pH 3,5 , B; metanol:buffer asetat pH 4,0 , C; metanol: buffer asetat pH 4,5 , D; metanol:buffer asetat pH 5,0 , E; metanol:buffer asetat pH 5,5. 1) sakarin, 2) kafein

2) Variasi fasa gerak

Dari variasi fasa gerak yang digunakan, didapatkan kondisi optimum fasa gerak untuk penentuan kafein adalah Metanol : Buffer asetat (30:70). Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada kromatogram berikut ini:



Gambar 2. Variasi komposisi fasa gerak terhadap waktu retensi. Laju alir 1 ml/menit, λ = 270 nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat pH 5,0. A; metanol:buffer asetat (90:10), B; metanol:buffer asetat (70:30), C; metanol:buffer asetat (50:50), D; metanol:buffer asetat (30:70), E; metanol:buffer asetat (10:90). 1) sakarin, 2) kafein.

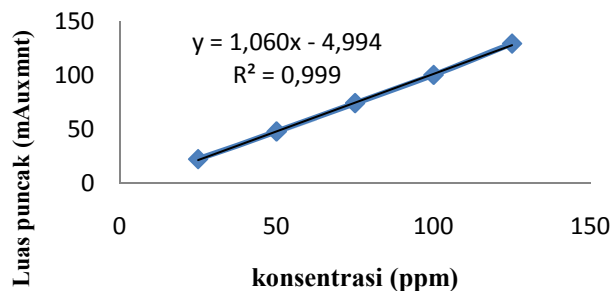
Berdasarkan kromatogram pada Gambar 2 di atas terlihat bahwa pemisahan yang terbaik antara kafein dan sakarin diperoleh pada variasi konsentrasi fasa gerak metanol : buffer asetat adalah 30 : 70. Pada kondisi ini, sakarin memberikan waktu retensi 4,35 menit, sedangkan kafein memberikan waktu retensi 8,42 menit. Meskipun pada konsentrasi fasa gerak metanol : buffer asetat 50 : 50 memberikan puncak kromatogram yang paling tinggi, tetapi tidak bisa dikatakan kondisi optimum karena memberikan waktu retensi yang berdekatan dan salah satu puncaknya muncul pada waktu retensi 3 menit. Dalam HPLC ada istilah *system peak*, yaitu puncak yang muncul meskipun tidak ada sampel yang diinjeksikan, biasanya muncul pada waktu retensi 3 menit. Dan berdasarkan luas puncaknya pada konsentrasi fasa gerak metanol : buffer asetat (30 : 70) memberikan pemisahan yang paling baik karena menghasilkan puncak yang paling luas. Hal ini juga disebabkan karena kepolaran sakarin dan kafein lebih mendekati terhadap kepolaran buffer.

D. Kurva regresi linear dari larutan standar kafein dan sakarin

1) Larutan Standar Kafein

Berdasarkan kondisi optimum yang diperoleh untuk variasi fasa gerak dilakukan pengukuran larutan standar kafein pada konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm dan diperoleh persamaan regresi linier seperti pada kurva di berikut ini:

Kurva Standar Kafein

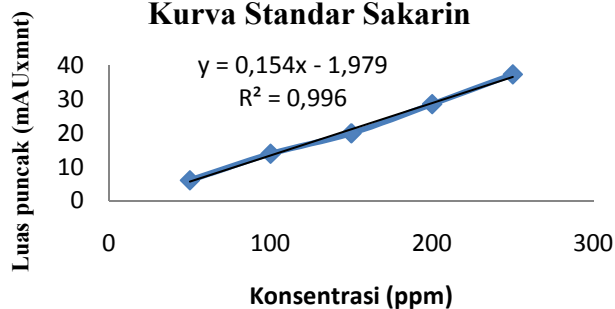


Gambar 3. Kurva standar kafein. Laju alir 1 ml/menit, λ = 270 nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70)

2) Larutan Standar Sakarin

Berdasarkan kondisi optimum yang diperoleh untuk variasi fasa gerak dilakukan pengukuran larutan standar sakarin pada konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm dan diperoleh persamaan regresi linier seperti pada kurva di bawah ini:

Kurva Standar Sakarin



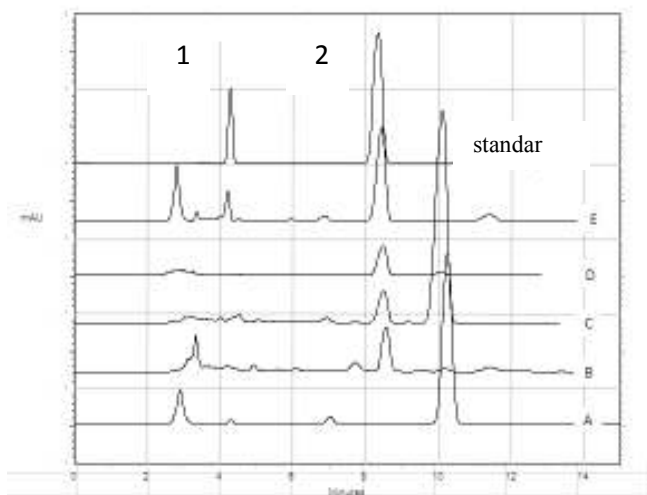
Gambar 4. Kurva standar sakarin. Laju alir 1 ml/menit, λ = 270 nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70)

E. Kromatogram analisis sampel

Telah dilakukan penentuan kadar kafein dan sakarin berdasarkan kondisi optimum pengukuran larutan standar.

1) Sampel yang dijual bebas di pasaran

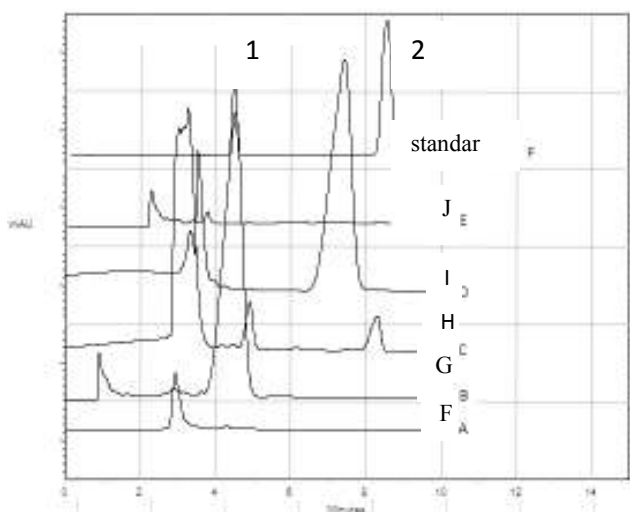
Pada Gambar 5 adalah kromatogram dari sampel yang dijual bebas di pasaran yang telah dianalisa menggunakan HPLC. Dapat dilihat pada gambar, standar adalah larutan standar kafein-sakarin, A adalah sampel dengan kode A dimana puncak dari kafein tidak ada yang berarti bahwa sampel minuman tersebut tidak mengandung kafein, sedangkan puncak dari sakarin ada yang menunjukkan bahwa minuman tersebut mengandung sakarin. B adalah sampel dengan kode B, C adalah sampel kode C, D adalah sampel kode D, dan D adalah sampel kode E dapat dilihat bahwa minuman ringan tersebut mengandung kafein dan sakarin.



Gambar 5. Kromatogram sampel yang dijual bebas dipasaran dan larutan standar kafein-sakarini. Laju alir 1 ml/menit, $\lambda = 270$ nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70) ; 1) sakarin; 2) kafein.

2) Sampel yang dijual bebas di Lingkungan Sekolah

Pada Gambar 6 adalah kromatogram dari sampel yang dijual bebas di Lingkungan Sekolah yang telah dianalisa dengan menggunakan HPLC. Dapat dilihat pada gambar, standar adalah larutan standar kafein-sakarini, F adalah sampel dengan kode F, G adalah sampel dengan kode G, H adalah sampel kode H, I adalah sampel kode I, dan J adalah sampel kode J. Pada sampel F dan G terdapat puncak sakarin dan tidak terdapat puncak kafein berarti pada sampel tersebut mengandung sakarin dan tidak mengandung kafein. Pada sampel H mengandung sakarin dan kafein sedangkan pada sampel I dan J mengandung kafein dan tidak mengandung sakarin. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 13 berikut ini:



Gambar 6. Kromatogram sampel yang dijual bebas di Lingkungan Sekolah dan larutan standar kafein-sakarini.

Laju alir 1 ml/menit, $\lambda = 270$ nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70) ;1) sakarin; 2) kafein.

Setelah didapatkan kromatogram untuk sampel, maka dilakukan penghitungan luas puncak dari masing-masing komponen yaitu untuk kafein dan sakarin. Beberapa sampel diencerkan karena konsentrasi kafein atau sakarin terlalu tinggi sehingga menyulitkan dalam analisa luas puncak.

F. Kadar kafein dan sakarin secara HPLC

Berdasarkan kurva regresi linear yang diperoleh untuk kedua sampel, maka kadar kafein dan sakarin dapat dihitung seperti berikut. Untuk sampel yang diencerkan, maka perhitungan kadar telah dikalikan dengan faktor pengenceran.

1) Sampel yang dijual bebas di pasaran

TABEL 1
KADAR KAFEIN DAN SAKARIN DARI SAMPEL
Laju alir 1 ml/menit, $\lambda = 270$ nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70)

No	Sampel	Kadar Kafein (ppm)	Kadar Sakarin (ppm)
1.	A	-	167,78
2.	B	186,24	176,37
3.	C	214,25	331,56
4.	D	131,86	-
5.	E	383,62	383,70

Dari Tabel 1 di atas dapat dilihat bahwa 5 sampel minuman ringan yang beredar di Kota Padang mengandung kafein dan sakarin dalam berbagai konsentrasi. Minuman dengan Kode E mempunyai konsentrasi kafein dan sakarin tertinggi yaitu 383,62 dan 383,70 ppm.

2) Sampel yang dijual bebas di Lingkungan Sekolah

TABEL 2
KADAR KAFEIN DAN SAKARIN DARI SAMPEL
Laju alir 1 ml/menit, $\lambda = 270$ nm, kolom ODS C18, fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70)

No	Sampel	Kadar Kafein (ppm)	Kadar Sakarin (ppm)
1.	F	-	-
2.	G	-	15551,23
3.	H	155,31	-
4.	I	-	-
5.	J	-	-

Dari Tabel 2 di atas dapat dilihat bahwa 5 sampel minuman ringan yang dijual bebas di Lingkungan Sekolah mengandung kafein dan sakarin dalam berbagai konsentrasi. Minuman dengan Kode G mempunyai konsentrasi sakarin tertinggi yaitu 15551,23 ppm sedangkan minuman dengan

konsentrasi kafein tertinggi adalah sampel kode H yaitu 155,31 ppm.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Analisis dengan menggunakan HPLC dilakukan pada panjang gelombang 270 nm, laju alir 1 ml/menit, fasa diam kolom ODS C18. fasa gerak metanol:buffer asetat (30:70), pH optimum adalah pH 5,0. Waktu retensi sakarin adalah 4,35 menit dan kafein 8,42 menit.
2. Pada sampel minuman ringan yang dianalisis terdapat kadar kafein dan sakarin dengan berbagai konsentrasi. Konsentrasi tertinggi kafein yaitu 383,62 ppm terdapat pada minuman ringan dengan kode E dan konsentrasi tertinggi sakarin yaitu 15551,23 ppm terdapat pada minuman ringan dengan kode G.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Nersyanti, Febri. 2006. Spektrofotometri Derivatif Ultraviolet untuk Penentuan Kadar Kafein dalam Minuman Suplemen dan Ekstrak Teh. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [2] Farmakologi Fakultas Kedokteran UI. 2002. Farmakologi dan Terapi. Ed ke-4. Jakarta: Gaya Baru.
- [3] J.W. Weyland, H. Rolink, D.A. Doornbos. 1982. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of saccharin, caffeine and benzoic acid using non-linear programming. *Journal of Chromatography A*, Volume 247, Issue 2, 1 October 1982, 221-229.
- [4] Qing-Chuan Chen, Jing Wang. 2001. Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, Volume 937, Issues 1-2, 57-64.
- [5] C.M. Lino, A. Pena. 2010. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chemistry*, Volume 121, Issue 2, 503-508.
- [6] Yandra, Arief. 2011. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan Fasa Gerak Metanol dan Buffer Fosfat untuk Penentuan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein. *Skripsi*. Padang: Universitas Andalas.
- [7] Weiss, Joachim, Ion Chromatography, 2 ed. 1995.