



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DENGAN FASA GERAK METANOL DAN BUFFER FOSFAT UNTUK PENETUAN ASAM BENZOAT, NATRIUM SAKARIN DAN KAFEIN**

**SKRIPSI**



**ARIEF YANDRA PUTRA  
07132010**

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG 2011**

## ABSTRAK

### KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DENGAN FASA GERAK METANOL DAN BUFFER FOSFAT UNTUK PENENTUAN ASAM BENZOAT, NATRIUM SAKARIN DAN KAFEIN

Oleh :

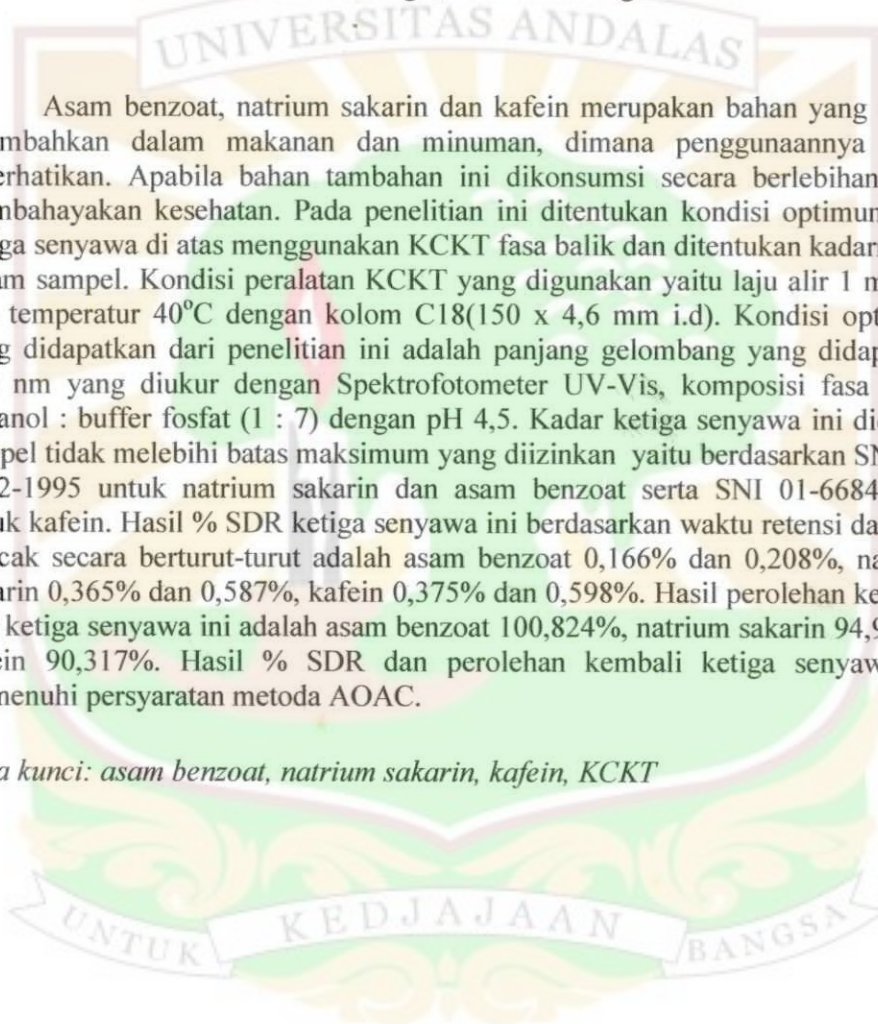
Arief Yandra Putra (07132010);

Prof. Dr. Hamzar Suyani, M.Sc\* dan Prof. Dr. Safni, M.Eng\*\*

\* Pembimbing I, \*\*Pembimbing II

Asam benzoat, natrium sakarin dan kafein merupakan bahan yang sering ditambahkan dalam makanan dan minuman, dimana penggunaannya harus diperhatikan. Apabila bahan tambahan ini dikonsumsi secara berlebihan akan membahayakan kesehatan. Pada penelitian ini ditentukan kondisi optimum dari ketiga senyawa di atas menggunakan KCKT fasa balik dan ditentukan kadarnya di dalam sampel. Kondisi peralatan KCKT yang digunakan yaitu laju alir 1 ml/min dan temperatur 40°C dengan kolom C18(150 x 4,6 mm i.d). Kondisi optimum yang didapatkan dari penelitian ini adalah panjang gelombang yang didapatkan 220 nm yang diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis, komposisi fasa gerak metanol : buffer fosfat (1 : 7) dengan pH 4,5. Kadar ketiga senyawa ini didalam sampel tidak melebihi batas maksimum yang diizinkan yaitu berdasarkan SNI 01-0222-1995 untuk natrium sakarin dan asam benzoat serta SNI 01-6684-2002 untuk kafein. Hasil % SDR ketiga senyawa ini berdasarkan waktu retensi dan luas puncak secara berturut-turut adalah asam benzoat 0,166% dan 0,208%, natrium sakarin 0,365% dan 0,587%, kafein 0,375% dan 0,598%. Hasil perolehan kembali dari ketiga senyawa ini adalah asam benzoat 100,824%, natrium sakarin 94,925%, kafein 90,317%. Hasil % SDR dan perolehan kembali ketiga senyawa ini memenuhi persyaratan metoda AOAC.

*Kata kunci: asam benzoat, natrium sakarin, kafein, KCKT*



# **HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY BY USING METHANOL AND PHOSPHATE BUFFER TO DETERMINE BENZOIC ACID, SODIUM SACCHARINE, And CAFFEINE**

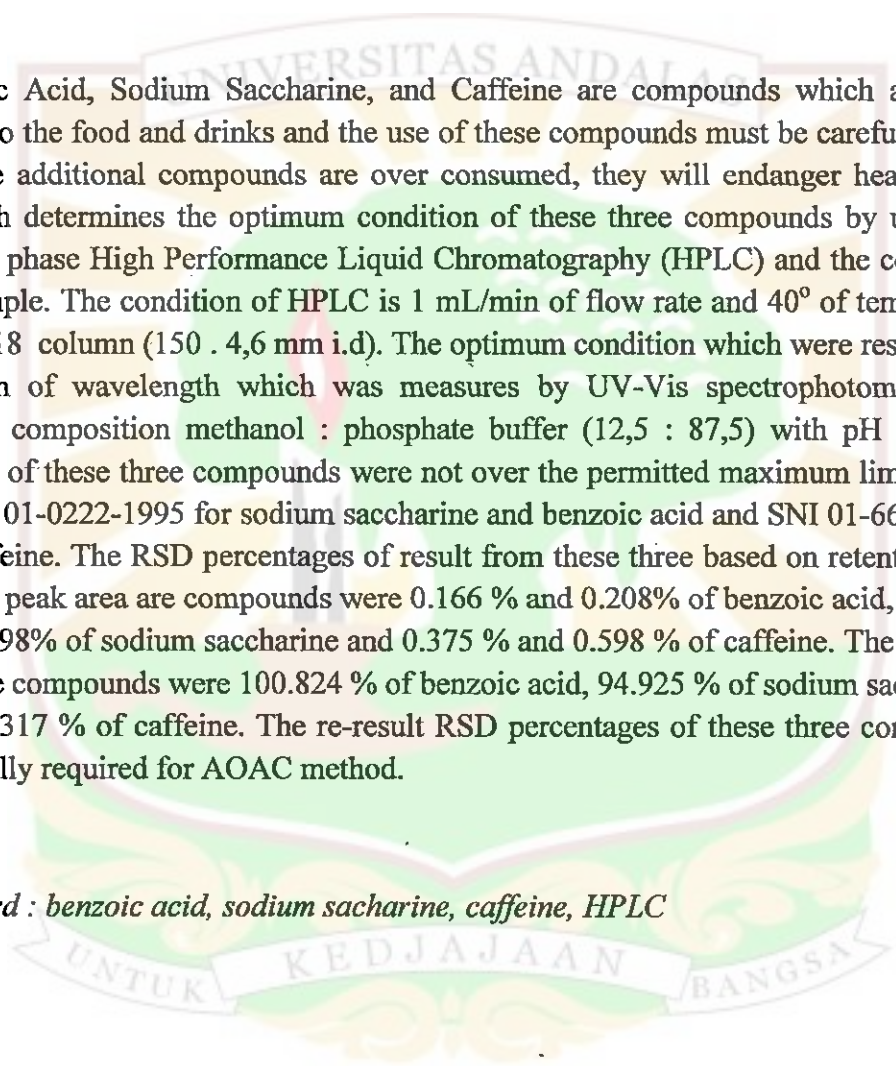
BY

**Arief Yandra Putra (07132010)**

Advised by Prof. Hamzar Suyani, M.Sc and Prof. Safni, M.Eng

Benzoic Acid, Sodium Saccharine, and Caffeine are compounds which are often added to the food and drinks and the use of these compounds must be carefully done. If these additional compounds are over consumed, they will endanger health. This research determines the optimum condition of these three compounds by using the reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the content of the sample. The condition of HPLC is 1 mL/min of flow rate and 40° of temperature with C18 column (150 . 4,6 mm i.d). The optimum condition which were resulted are 220 nm of wavelength which was measures by UV-Vis spectrophotometer, the eluen's composition methanol : phosphate buffer (12,5 : 87,5) with pH 4,5. The content of these three compounds were not over the permitted maximum limit, based on SNI 01-0222-1995 for sodium saccharine and benzoic acid and SNI 01-6684-2002 for caffeine. The RSD percentages of result from these three based on retention time and the peak area are compounds were 0.166 % and 0.208% of benzoic acid, 0.365 % and 0.598% of sodium saccharine and 0.375 % and 0.598 % of caffeine. The re-result of these compounds were 100.824 % of benzoic acid, 94.925 % of sodium saccharine, and 90.317 % of caffeine. The re-result RSD percentages of these three compounds were fully required for AOAC method.

*Keyword : benzoic acid, sodium sacharine, caffeine, HPLC*



## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur Penulis ucapkan kepada Allah SWT atas Rahmat dan Hidayat-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dengan Fasa Gerak Metanol dan Buffer fosfat Untuk Penentuan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein”**. Penulisan skripsi ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas.

Dalam penulisan dan penyusunan skripsi ini penulis banyak mendapatkan masukan, bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Kepada Kedua Orang Tua dan seluruh keluarga penulis yang telah memberikan dukungan baik moral atau materil
2. Bapak Prof. Dr. Hamzar Suyani, M.Sc dan Ibu Prof. Dr. Safni, M.Eng sebagai dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, arahan, motifasi kepada penulis
3. Bapak Dr. Adlis Antoni, M.Si sebagai Ketua Jurusan Kimia.
4. Bapak Dr. Mai Efdi selaku Koordinator Pendidikan Jurusan Kimia
5. Ibu Olly Norita Tetra, M.Si sebagai Dosen Pembimbing Akademik
6. Seluruh Staf pengajar Jurusan Kimia.
7. Ibu Nofrida, selaku analis laboratorium Analisis Terapan atas segala dukungan dan mempermudah kerja selama di laboratorium
8. Rekan-rekan kerjaku di Laboratorium Analisis Terapan atas segala dukungan dan do'anya dan Laboratorium Central Universitas Andalas
9. Operator alat KCKT saudari Fitrah Hayuni
10. Teman-teman seperjuangan serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.



Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki berbagai kekurangan, karena itu segala kritik dan saran sangat penulis harapkan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua. Amin.

Padang, Agustus 2011

Penulis



# DAFTAR ISI

<b>HALAMAN PERSYARATAN</b>	
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b>	
<b>ABSTRAK</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>KATA PENGANTAR</b>	<b>i</b>
<b>DAFTAR ISI</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b>	<b>viii</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Minuman Ringan	4
2.2 Bahan Pengawet	5
2.2.1 Asam Benzoat	6
2.3 Bahan Pemanis	7
2.3.1 Tujuan Penggunaan Bahan Pemanis Sintetis	7
2.3.2 Natrium Sakarin	7
2.4 Kafein	9
2.5 Spektrofotometer	10
2.6 Metoda Analisis Kromatografi	11
2.7 Sistem Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	12
2.7.1 Sistem Injeksi	12
2.7.2 Sistem pompa	13
2.7.3 Fasa Gerak	13
2.7.4 Fasa Diam (kolom)	14
2.7.5 Sistem Deteksi	15

2.8 Validasi Metoda Analisis	15
2.8.1 Kecermatan/ketepatan	16
2.8.2 Ketelitian	16
<b>III. METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan	17
3.3 Persiapan Sampel	17
3.4 Pembuatan Fasa Gerak	17
3.5 Pembuatan Larutan Asam Benzoat, Natrium sakarin, Kafein	18
3.6 Penentuan Kondisi Optimum	18
3.6.1 Panjang gelombang Optimum Secara Spektrofotometri UV	18
3.6.2 Penentuan pH Buffer Fosfat Sebagai Komponen Fasa Gerak	18
3.6.3 Penentuan Komposisi Fasa Gerak optimum	18
3.7 Pembuatan Kurva Kalibrasi	18
3.8 Penentuan Kadar Asam Benzoat, Natrium Sakarin, Kafein Dalam Minuman ringan	19
3.9 Penentuan Standar Deviasi Relatif	19
3.10 Penentuan Perolehan Kembali	20
<b>IV. HASIL DAN DISKUSI</b>	
4.1 Penentuan Kondisi Optimum Pemisahan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein	21
4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum Secara Spektrofotometri UV	21
4.1.2 Penentuan pH Buffer Fosfat sebagai Komponen Fasa Gerak	22
4.1.3 Penentuan Komposisi Fasa Gerak Optimum	23
4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Benzoat, Natrium Sakarin Dan Kafein	24

4.3 Penentuan Kadar Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein dalam Sampel Minuman Ringan	26
4.4 Penentuan Nilai Standar Deviasi Relatif (SDR) dari masing-masing senyawa	29
4.5 Penentuan Perolehan Kembali (Recovery)	30
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRAN</b>	



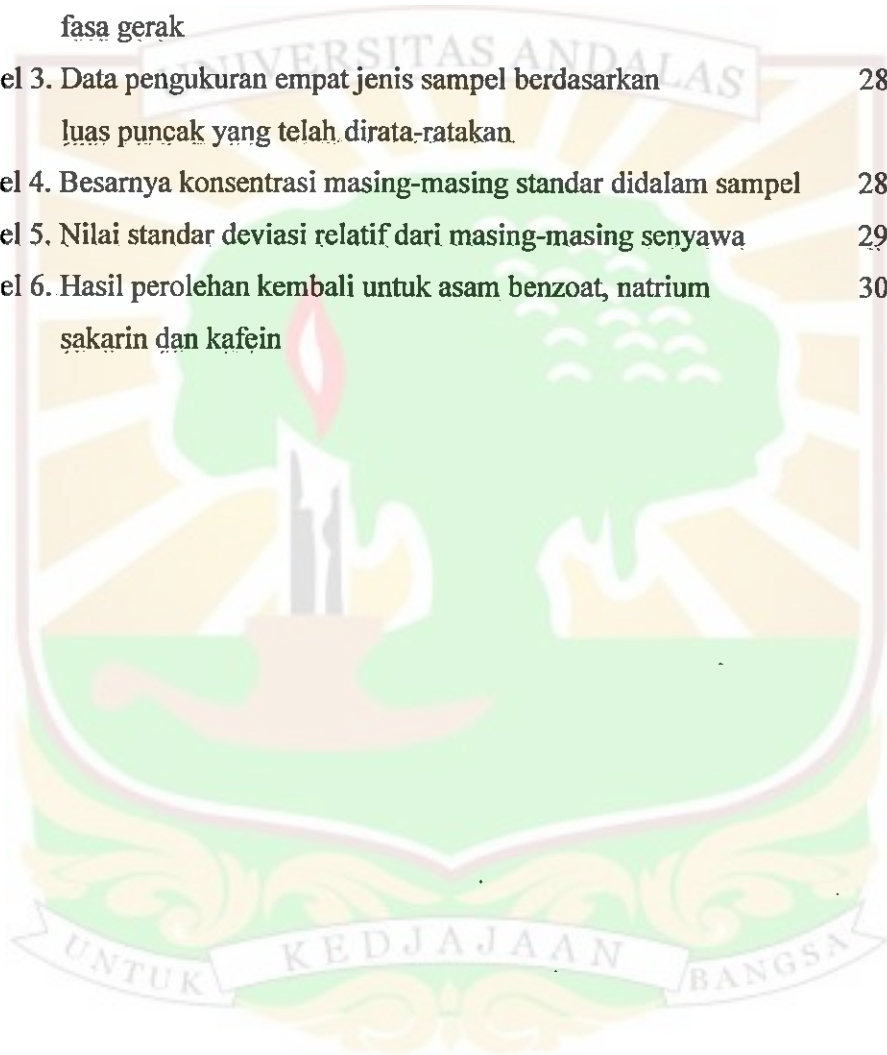


## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Asam Benzoat	6
Gambar 2. Struktur Natrium Sakarin	8
Gambar 3. Struktur Kafein	9
Gambar 4. Skema Peralatan KCKT	12
Gambar 5. Tipe Injektor Katup Putaran	13
Gambar 6. Spektrum UV Optimum Pemisahan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein	21
Gambar 7. Kromatogram pemisahan asam benzoat, natrium sakarin, dan kafein	23
Gambar 8. Kurva kalibrasi beberapa konsentrasi larutan standar Asam Benzoat, Natrium Sakarin, Kafein dengan luas puncak	25
Gambar 9. Kromatogram masing-masing sampel	26

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Pengaruh pH buffer fosfat sebagai campuran fasa gerak terhadap waktu pemisahan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein	22
Tabel 2. waktu retensi dan luas puncak dari asam benzoat, natrium sakarin dan kafein pada berbagai komposisi fasa gerak	24
Tabel 3. Data pengukuran empat jenis sampel berdasarkan luas puncak yang telah dirata-ratakan	28
Tabel 4. Besarnya konsentrasi masing-masing standar didalam sampel	28
Tabel 5. Nilai standar deviasi relatif dari masing-masing senyawa	29
Tabel 6. Hasil perolehan kembali untuk asam benzoat, natrium sakarin dan kafein	30



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kromatogram pengujian masing-masing standar	34
Lampiran 2. Perhitungan persamaan regresi dan koefisien determinasi Asam Benzoat	35
Lampiran 3. Perhitungan persamaan regresi dan koefisien determinasi Natrium Sakarin	36
Lampiran 4. Perhitungan persamaan regresi dan koefisien determinasi Kafein	37
Lampiran 5. Data pengukuran empat jenis sampel dan perhitungan kadar	38
Lampiran 6. Perhitungan standar deviasi relatif natrium sakarin, asam benzoat dan kafein	40
Lampiran 7. Hasil perolehan kembali	42
Lampiran 8. Nilai % SDR dan perolehan kembali berdasarkan Metoda AOAC	43
Lampiran 9. Batas maksimum penggunaan asam benzoat, natrium Sakarin dan kafein	

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Seiring dengan meningkatnya pertumbuhan industri makanan dan minuman di Indonesia, telah terjadi peningkatan produksi minuman ringan yang beredar di masyarakat. Pada minuman ringan sering ditambahkan kafein, pengawet dan pemanis buatan yang kadarnya perlu diperhatikan, karena apabila konsumsinya berlebihan dapat membahayakan kesehatan.

Bahan pengawet pada bahan makanan dan minuman tidak bisa dipungkiri keberadaannya. Pengawet merupakan bahan yang ditambahkan untuk mencegah atau menghambat terjadinya kerusakan atau pembusukan pada makanan atau minuman. Dengan penambahan pengawet produk minuman diharapkan dapat terpelihara keseegarannya. Dimana bahan pengawet ini banyak digunakan pada minuman bersoda. Meski kandungan bahan pengawet tersebut umumnya tidak terlalu besar, akan tetapi jika dikonsumsi secara terus menerus akan memberikan efek terhadap kesehatan<sup>1</sup>.

Pemanis merupakan senyawa kimia yang sering ditambahkan dan digunakan untuk produk olahan pangan, industri, serta minuman dan makanan kesehatan. Pemanis berfungsi meningkatkan cita rasa dan aroma, memperbaiki sifat-sifat fisik, dan merupakan sumber kalori bagi tubuh. Perkembangan industri pangan dan minuman akan kebutuhan pemanis dari tahun ketahun semakin meningkat. Industri pangan dan minuman lebih menyukai penggunaan pemanis sintesis karena harganya relatif murah, tingkat kemanisan pemanis sintesis jauh lebih tinggi dari pemanis alami. Hal tersebut menyebabkan terus meningkatnya penggunaan pemanis sintesis terutama natrium sakarin<sup>2</sup>.

Kafein merupakan salah satu derivat xantin yang mempunyai daya kerja sebagai pemberi efek stimulan sistem saraf pusat, stimulan otot jantung, relaksasi otot polos dan meningkatkan diuresis dengan tingkatan yang berbeda. Efek kafein dapat meningkat apabila berinteraksi dengan beberapa jenis obat antara lain : obat asma, dan pil KB. Akibatnya mungkin terjadi kofeinisme disertai rasa gelisah,



sakit kepala, pernafasan cepat dan insomnia. Kafein dapat menghilangkan rasa letih, lapar dan mengantuk. Penggunaan kafein yang berlebihan dapat menimbulkan jantung yang berdebar, gangguan lambung, tangan gemetar, gelisah, daya ingat berkurang dan sukar tidur<sup>3</sup>.

Analisis bahan tambahan yang terdapat di dalam minuman ringan yaitu asam benzoat sebagai pengawet, natrium sakarin sebagai pemanis dan kafein sebagai pemberi efek stimulan menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), karena analisis dengan KCKT cepat, daya pisah baik, persiapan sampel mudah, dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai<sup>4</sup>.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian terhadap bahan tambahan yang terdapat dalam minuman ringan yaitu asam benzoat sebagai pengawet, natrium sakarin sebagai pemanis sintesis dan kafein sebagai pemberi efek stimulan.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah yang akan diteliti dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimana kondisi optimum, ketelitian dan ketepatan metoda KCKT menggunakan fasa gerak metanol : buffer fosfat untuk penentuan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein ?
2. Berapa kadar asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dalam sampel minuman ringan dan dibandingkan dengan SNI ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menentukan kondisi optimum penentuan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein menggunakan metode KCKT fasa balik menggunakan fasa gerak metanol : buffer fosfat
2. Mengetahui kadar asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dalam sampel minuman ringan
3. Mengetahui ketelitian dan ketepatan metoda KCKT dalam pemisahan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein



#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat melengkapi informasi dasar dalam pemisahan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dengan metoda KCKT sehingga dapat bermanfaat bagi masyarakat, pemerintah dan berbagai industri yang ingin menggunakan metoda ini nantinya.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Minuman Ringan

Minuman ringan adalah minuman yang tidak mengandung alkohol. Minuman ini banyak disukai karena rasanya yang nikmat, siap saji dan sangat memenuhi selera bagi mereka yang sedang dahaga, terutama setelah berolahraga dan bekerja berat. Selain itu, minuman ringan juga tersedia dalam berbagai rasa, umumnya buah-buahan<sup>5</sup>.

Di Amerika Serikat, istilah *softdrink* digunakan untuk membedakan minuman tersebut dari *liquor* (minuman beralkohol) sehingga minuman yang tidak beralkohol disebut *softdrink*. Sedangkan di Indonesia istilah *softdrink* lebih populer untuk minuman ringan berkarbonasi dengan asumsi bahwa benar minuman ini memang “ringan” status gizinya. Minuman ini, selain kadar gulunya yang tinggi, tidak memiliki zat gizi lain yang berarti. Minuman yang tidak berkarbonasi tidak termasuk *softdrink*, seperti teh botol, jus buah dan sebagainya. Kini telah banyak varian produk baru dari *softdrink*, namun pada umumnya minuman ringan itu dibagi menjadi minuman ringan “jernih” (*clear softdrink*) yakni yang tidak berwarna seperti Sprite, 7-Up dan sejenisnya. Ada pula yang ditambah dengan zat pewarna seperti Fanta, Mirinda dan sejenisnya. Ada yang tergolong jenis Cola, serta ada pula berbentuk “minuman ringan diet” seperti Diet Cola, Pepsi Diet yang diperuntukkan bagi mereka yang sedang berdiet atau mengurangi kalori dalam makanannya<sup>5</sup>.

Adapun komposisi minuman ringan diantaranya air merupakan komponen utama minuman ringan, CO<sub>2</sub> berfungsi untuk memperbaiki rasa minuman, pemanis yang terdapat pada *softdrink* regular merupakan sukrosa (gula tebu), sirup fruktosa atau HFCS (*High Fructose Corn Syrup*) dan pada *softdrink* diet berupa aspartam, sakarin atau siklamat, zat pengawet dimana minuman ringan diawetkan dengan asam benzoat merupakan suatu bahan pengawet sintetis yang aman untuk bahan pangan namun ada batas maksimal yang harus diperhatikan, kafein (terutama pada jenis cola dan *coffee cream*) dengan kadar yang cukup

tinggi, membantu seseorang tetap terjaga/tidak mengantuk, jantung dapat berdetak kencang sehingga tidak direkomendasikan bagi mereka yang hipertensi, berpotensi serangan jantung koroner dan stroke, penambah rasa buatan contohnya rasa jeruk, rasa strawberry, rasa nanas dan sebagainya, zat pewarna yang berupa zat pewarna alamiah seperti karamel dan zat pewarna sintetis seperti karmoisin dan tartrazin<sup>5</sup>.

## 2.2 Bahan Pengawet

Bahan pengawet adalah senyawa yang mampu menghambat dan menghentikan proses fermentasi, pengasaman atau bentuk kerusakan lainnya, atau bahan yang dapat memberikan perlindungan bagi bahan pangan dari pembusukan<sup>1</sup>.

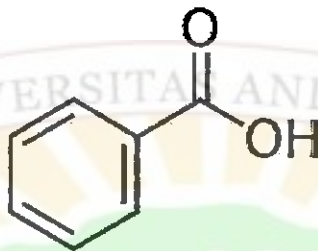
Pemakaian bahan pengawet dari satu sisi menguntungkan karena dengan bahan pengawet, bahan pangan dapat dibebaskan dari kehidupan mikroba, baik yang bersifat patogen yang dapat menyebabkan keracunan atau gangguan kesehatan lainnya maupun mikroba yang non patogen yang menyebabkan kerusakan bahan pangan, misalnya pembusukan. Namun dari sisi lain, bahan pengawet pada dasarnya adalah senyawa kimia yang merupakan bahan asing yang masuk bersama bahan pangan yang dikonsumsi. Jika dosis pemakaian bahan pengawet tidak diatur dan diawasi, kemungkinan besar menimbulkan kerugian bagi pemakainya, baik yang bersifat langsung misalnya keracunan ataupun yang bersifat tidak langsung atau kumulatif misalnya apabila bahan pengawet yang digunakan bersifat karsinogenik. Dalam kehidupan modern seperti sekarang ini banyak dijumpai pemakaian bahan pengawet secara luas sebagai contoh bahan pangan keluaran pabrik pada umumnya menggunakan bahan tambahan pangan (*food additive*) termasuk didalamnya bahan pengawet secara sengaja ditambahkan agar bahan pangan yang dihasilkan dapat mempertahankan kualitasnya dan memiliki umur simpan yang lebih lama sehingga memperluas jangkauan distribusinya<sup>2</sup>.

Adapun beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh bahan pengawet adalah dapat memperpanjang umur simpan dalam pangan, tidak menurunkan kualitas (warna, cita rasa, dan bau) bahan pangan yang diawetkan, mudah dilarutkan, menunjukkan sifat-sifat anti mikroba pada jenjang pH yang diawetkan, aman dalam jumlah yang diperlukan, mudah ditentukan dengan analisis kimia,

tidak menghambat enzim pencernaan, tidak didekomposisi atau tidak bereaksi untuk suatu senyawa kompleks yang bersifat toksik dan mudah dikontrol atau didistribusikan secara merata dalam bahan pangan <sup>1</sup>.

### 2.2.1 Asam Benzoat

Asam benzoat memiliki struktur kimia seperti Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Asam Benzoat

Asam benzoat memiliki rumus molekul  $C_6H_5COOH$  dan berat molekul 122,12 g/ mol. Secara umum, asam benzoat berbentuk jarum atau sisik, putih, sedikit berbau, biasanya berbau benzaldehida atau benzoin. Adapun sifat lainnya sedikit larut dalam air, agak mudah menguap pada suhu hangat, mudah menguap dalam uap air, mudah larut dalam etanol, dalam kloroform dan eter <sup>6</sup>.

Asam benzoat merupakan bahan pengawet yang luas penggunaannya dan sering digunakan pada bahan makanan yang asam. Bahan pengawet ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri penghasil toksin (racun), bakteri spora, dan bakteri pembusuk. Bahan makanan dan minuman yang diberi benzoat dapat memberikan kesan aroma fenol. Asam benzoat digunakan untuk mengawetkan minuman ringan, minuman anggur, saus sari buah, sirup dan ikan asin. Bahan ini menyebabkan dampak negatif pada penderita asma dan bagi orang yang peka terhadap aspirin <sup>1</sup>.

Dampak penggunaan asam benzoat bagi tubuh antara lain bisa menimbulkan reaksi alergi dan penyakit saraf, Berdasarkan Penelitian Badan Pangan Dunia (FAO), konsumsi asam benzoat yang berlebihan pada tikus akan menyebabkan kematian dengan gejala-gejala hiperaktif, sawan, buang air kecil terus-menerus dan penurunan berat badan <sup>1</sup>. Menurut PerMenKes RI



No.722/MenKes/Per/IX/1988 tentang bahan tambahan pangan, batas maksimum penggunaan asam benzoat dalam minuman ringan adalah 600 mg/kg<sup>2</sup>.

### **2.3 Bahan Pemanis**

Pemanis merupakan senyawa kimia yang sering ditambahkan dan digunakan untuk produk olahan pangan, industri serta minuman dan makanan kesehatan. Pemanis berfungsi untuk meningkatkan cita rasa dan aroma, memperbaiki sifat-sifat fisik, memperbaiki sifat-sifat kimia, sekaligus merupakan sumber kalori yang penting bagi tubuh. Perkembangan industri pangan dan minuman akan kebutuhan pemanis dari tahun ketahun semakin meningkat. Industri pangan dan minuman lebih menyukai penggunaan pemanis sintetis karena harganya relatif murah, tingkat kemanisan pemanis sintetis jauh lebih tinggi dari pemanis alami. Hal tersebut terus menyebabkan meningkatnya penggunaan pemanis sintetis terutama natrium sakarin<sup>2</sup>.

Bahan tambahan makanan lain adalah pemanis berkalori rendah atau tanpa energi sama sekali. Zat pemanis sintetis merupakan zat yang dapat menimbulkan rasa manis atau dapat membantu mempertajam penerimaan terhadap rasa manis tersebut, sedangkan kalori yang dihasilkannya jauh lebih rendah daripada gula<sup>1</sup>.

#### **2.3.1 Tujuan Penggunaan Bahan Pemanis Sintetis**

Pemanis sintetis ditambahkan kedalam bahan pangan mempunyai beberapa tujuan diantaranya sebagai untuk memenuhi kebutuhan kalori rendah untuk penderita kegemukan, menghindari kerusakan gigi, dan pada industri pangan dan minuman, termasuk industri rokok, pemanis sintetis dipergunakan dengan tujuan untuk menekan biaya produksi karena pemanis sintetis ini selain mempunyai tingkat rasa manis yang lebih tinggi juga harganya relatif murah dibandingkan dengan gula yang diproduksi di alam<sup>2</sup>.

#### **2.3.2 Natrium Sakarin**

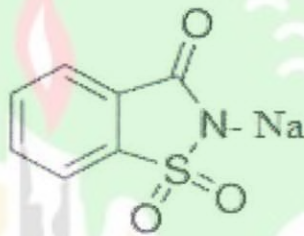
Natrium sakarin sebagai pemanis buatan mempunyai rumus kimia  $C_7H_4NaNO_3S \cdot 2H_2O$ . Secara umum, natrium sakarin berbentuk kristal putih, tidak berbau atau berbau aromatik lemah, dan mudah larut dalam air, serta berasa



manis. Natrium sakarin memiliki tingkat kemanisan relatif sebesar 300 sampai dengan 500 kali tingkat kemanisan sukrosa dengan tanpa nilai kalori. Kombinasi penggunaannya dengan pemanis buatan rendah kalori lainnya bersifat sinergis<sup>7</sup>.

Intensitas natrium sakarin cukup tinggi yaitu 200-700 kali sukrosa 10%. Disamping rasa manis natrium sakarin juga mempunyai rasa pahit yang disebabkan oleh kemurnian yang rendah dari proses sintetik. Pemerintah Indonesia mengeluarkan peraturan melalui Menteri Kesehatan RI No.208/MenKes/Per/IV/1985 tentang pemanis buatan dan No.722/MenKes/Per/IX/1988 tentang bahan tambahan pangan, bahwa pada pangan dan minuman olahan khusus yaitu berkalori rendah dan untuk penderita penyakit diabetes mellitus kadar maksimum sakarin yang diperbolehkan adalah 300 mg/kg<sup>2</sup>.

Adapun struktur natrium sakarin dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2. Struktur Natrium Sakarin

#### *Manfaat Natrium sakarin*

Natrium sakarin secara luas digunakan sebagai pengganti gula dengan bahan pemanis lain seperti siklamat dan aspartam. Produk pangan yang menggunakan natrium sakarin diantaranya adalah minuman ringan, permen, selai, bumbu salad, gelatin rendah kalori, dan hasil olahan lain tanpa gula. Selain itu natrium sakarin digunakan sebagai bahan tambahan produk kesehatan mulut seperti pasta gigi, dan obat pencuci atau penyegar mulut<sup>2</sup>.

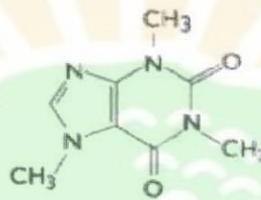
#### *Dampak penggunaan natrium sakarin yaitu:*

Natrium sakarin didalam tubuh tidak mengalami metabolisme sehingga disekresikan melalui urin tanpa perubahan kimia. Hasil penelitian *National Academy of Science* tahun 1968 menyatakan bahwa konsumsi sakarin oleh orang dewasa sebanyak 1 gram atau lebih menyebabkan terjadinya gangguan kesehatan.

Pada penelitian lain menyebutkan sakarin pada dosis yang tinggi dapat menyebabkan kanker pada hewan percobaan. Pada tahun 1977 *Canada's Health Protection Branch* melaporkan bahwa sakarin menyebabkan terjadinya kanker kandung kemih<sup>2</sup>.

## 2.4 Kafein

Kafein merupakan senyawa alkaloid xantin yang banyak terdapat dalam kopi dan teh dengan rumus 1,3,7-trimetilsantin (kafein). Struktur dari kafein dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kafein

Kafein merupakan basa sangat lemah. Kafein terdapat sebagai serbuk putih atau sebagai jarum putih mengkilat, tidak berbau dan rasanya pahit. Kafein larut dalam air (1:50), alkohol (1:75) atau kloroform(1:6) tetapi kurang larut dalam eter. Kelarutan naik dalam air panas (1:6 pada 80°C) atau alkohol panas (1:25 pada 60°C)<sup>8</sup>.

Kafein ditemukan pertama kali pada tahun 1827 dan dinamakan *theine* yang terdapat pada teh. Namun, setelah diketahui bahwa *theine* pada teh memiliki sifat yang sama dengan kafein pada kopi, maka nama *theine* tidak digunakan lagi. Jumlah kafein yang terkandung di dalam teh tergantung pada berbagai faktor seperti jenis daun teh, tempat tumbuhnya tanaman teh, ukuran partikel teh, serta metoda dan lamanya waktu penyeduhan. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa lokasi perkebunan teh mempengaruhi kadar kafein pada daun teh tersebut<sup>9</sup>.

Bersama-sama dengan teobromin dan teofilin, kafein, termasuk ke dalam senyawa kimia golongan xanthin. Ketiga senyawa tersebut mempunyai daya kerja sebagai stimulan sistem syaraf pusat, stimulan otot jantung, meningkatkan aliran darah melalui arteri koroner, relaksasi otot polos, dan aktif sebagai diuretika, dengan tingkatan yang berbeda. Tidak sama dengan yang lain, daya kerja sebagai

stimulan sistem syaraf pusat dari kafein sangat menonjol sehingga umumnya digunakan sebagai stimulan sentral.

Daya kerja sebagai diuretika dari kafein, didapat dengan beberapa cara seperti meningkatkan aliran darah dalam ginjal dan kecepatan filtrasi glomerulus, tapi terutama sebagai akibat pengurangan reabsorpsi tubuler normal. Kafein dapat mengakibatkan ketagihan ringan. Orang yang biasa minum kopi atau teh akan menderita sakit kepala pada pagi hari, atau setelah kira-kira 12-16 jam dari waktu ketika terakhir kali mengkonsumsinya. Metabolisme di dalam tubuh manusia akan mengubah kafein menjadi lebih dari 25 metabolit, terutama paraxanthine, theobromine, dan theophylline. Jika terlampau banyak mengkonsumsi kafein akan menyebabkan sakit maag, insomnia, pusing, dan gemeteran <sup>10</sup>.

## 2.5 Spektrofotometer

Sesuai dengan namanya spektrofotometer merupakan alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Dimana spektrometer adalah menghasilkan sinar pada panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi, spektrofotometer adalah suatu alat yang digunakan untuk mengukur energi yang ditransmisikan, diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang <sup>11</sup>.

Kelebihan spektrofotometer dibandingkan dengan metoda fotometer adalah panjang gelombang dari sinar putih dapat lebih terseleksi dan diperoleh dengan alat pengurai seperti prisma, grating atau celah optis. Pada fotometer filter, sinar dengan panjang gelombang yang diinginkan diperoleh dengan berbagai filter dari berbagai warna yang mempunyai spesifikasi melewati trayek pada panjang gelombang tertentu <sup>11</sup>.

Spektrofotometer terdiri dari sumber spektrum yang tampak kontinu, monokromator, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blanko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan absorpsi antara sampel dan blanko atau pembanding. Ada beberapa bagian peralatan spektrofotometri diantaranya Sumber cahaya yang biasa digunakan pada spektroskopi absorpsi adalah lampu wolfram. Arus cahaya tergantung pada tegangan lampu sedangkan sumber cahaya pada spektroskopi UV adalah lampu hidrogen atau lampu deuterium. Keunggulan lampu wolfram adalah



energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang. Monokromator digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis yang alatnya berupa prisma atau grating. Sel absorpsi dilakukan pada pengukuran daerah sinar tampak, kuvet kaca atau kuvet kaca korex dapat digunakan, sedangkan pengukuran daerah UV harus digunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Umumnya tebal kuvetnya adalah 10 mm, tetapi yang lebih kecil atau sebaliknya dapat digunakan. Sel yang digunakan berbentuk persegi, tetapi bentuk silinder bida digunakan. Gunakan kuvet yang tertutup untuk pelarut organik. Detektor, peranan detektor adalah untuk memberikan respons terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang <sup>11</sup>.

## **2.6 Metoda Analisis Kromatografi**

Menurut Braun, kromatografi adalah suatu teknik pemisahan komponen dalam suatu campuran pada fasa diam oleh fasa gerak. Dalam kromatografi terdapat tiga hal yang berperan penting yaitu fasa gerak, fasa diam dan analit dalam sampel yang akan dianalisis <sup>12</sup>.

Kromatografi terbagi atas beberapa jenis yaitu kromatografi cair, gas, adsorpsi, ion dan partisi. Jenis kromatografi yang digunakan tergantung pada jenis analit yang dianalisis. Pada penentuan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein kromatografi yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sistem kromatografi ini sesuai untuk analisis senyawa yang tidak mudah menguap dan labil atau tidak tahan terhadap panas <sup>11</sup>.

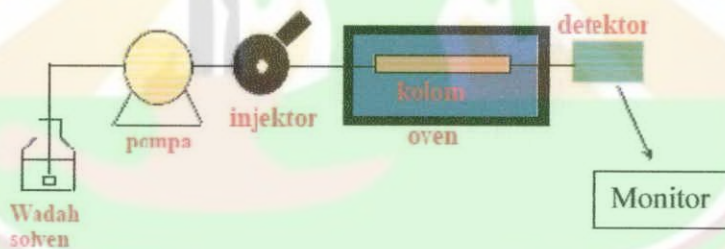
Pada sistem KCKT data yang dihasilkan berupa kromatogram yang meliputi waktu retensi dan luas puncak. Analisis kualitatif dan kuantitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari luas puncak standar senyawa murni. Beberapa keuntungan penggunaan KCKT sebagai berikut analisis dilakukan dalam waktu cepat, daya pisahnya baik, kepekaan terhadap detektor spesifik, kolom KCKT dapat dipakai kembali, cocok untuk analisis senyawa bermolekul besar dan kecil <sup>13</sup>.

Metoda KCKT terbagi atas dua sistem yaitu sistem fasa balik dan sistem fasa normal. Perbedaan dari kedua sistem tersebut adalah kepolaran dari fasa gerak, fasa diam, dan analit yang dianalisis. Ada beberapa perbedaan lain sistem

fasa balik dengan fasa normal diantaranya fasa balik dimana fasa diam yang digunakan bersifat non polar, fasa gerak yang digunakan bersifat polar dan analit yang dipisahkan bersifat polar sedangkan fasa normal dimana fasa diam yang digunakan bersifat polar, fasa gerak yang digunakan bersifat non polar dan analit yang dipisahkan bersifat non polar<sup>14</sup>. Ada beberapa keuntungan menggunakan kromatografi fasa balik sebagai berikut senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada KCKT fasa normal akan dapat dipisahkan pada KCKT fasa balik. Dengan KCKT fasa balik, air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada campuran pelarut<sup>15</sup>.

## 2.7 Sistem Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

KCKT dioperasikan dalam bentuk *elution*, dimana sejumlah besar sampel yang dipisahkan diinjeksikan dengan menggunakan injektor yang berada diantara pompa dan kolom. Bersamaan dengan fasa gerak (eluen), sampel akan mengalir dari ujung atas kolom, melewati kolom, kemudian keluar dari kolom dengan kecepatan berbeda dan masuk ke dalam *flow cell* detektor dengan waktu yang berbeda pula. Skema peralatan KCKT dapat dilihat pada Gambar 4.



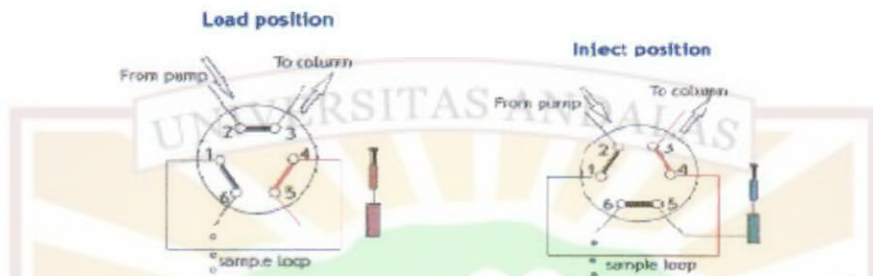
Gambar 4. Skema peralatan KCKT

### 2.7.1 Sistem Injeksi

Kerja kolom berhubungan langsung dengan persiapan injeksi sampel ke dalam kolom. Injektor adalah tempat memasukkan sampel atau cuplikan yang akan dianalisis ke dalam alat kromatografi. Untuk mendapatkan pemisahan yang sempurna, selain kolom yang baik juga ditentukan oleh banyaknya cuplikan yang dimasukkan ke dalam sistem injektor<sup>14</sup>.



*Loop injector* memiliki 2 posisi *valve* yaitu posisi *sample loop* yang merupakan tempat menampung sampel sebelum dielus oleh eluen dan posisi saat eluen dapat melewati loop untuk mengelusi sampel tersebut. Injektor dapat dikatakan baik apabila dapat memasukkan cuplikan ke dalam kolom sesempit mungkin, memiliki ketepatan ulang yang tinggi dan mudah digunakan<sup>14</sup>. Skema tipe injektor peralatan KCKT dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Tipe Injektor Katup Putaran

### 2.7.2 Sistem Pompa

Pompa digunakan untuk mendorong fasa gerak atau eluen melewati kolom. Pada saat pemompaan eluen diperlukan tekanan yang besar. Hal tersebut disebabkan karena ukuran dari partikel fasa diam yang kecil.

Sistem pompa merupakan komponen yang penting untuk menentukan hasil resolusi, kecepatan analisis dan reproduksibilitas analisis. Pompa yang baik harus memiliki pengaliran yang stabil tanpa getaran untuk meminimalkan gangguan pada detektor, tahan terhadap semua jenis dan volume pengaliran untuk analisis harus konstan dengan kecepatan pengaliran umumnya 0,5-10 ml/menit<sup>14</sup>.

Pada dasarnya pompa terdiri dari pompa dengan tekanan tetap (*constant-pressure pump*) dan pompa dengan aliran tetap (*constant-flow pump*). Pompa dengan aliran tetap terbagi lagi menjadi sistem kontinu dan diskontinyu. Dengan demikian diharapkan pompa tersebut dapat mengalirkan eluen secara konstan dan kontinu ke dalam kolom<sup>16</sup>.

### 2.7.3 Fasa Gerak

Fasa gerak disebut juga sebagai eluen berfungsi untuk membawa sampel melewati kolom dan mengelusi komponen sampel yang terdistribusi antara fasa gerak dan fasa diam. Retensi analit tergantung pada kekuatan interaksi antara fasa gerak dan

fasa diam, sehingga pemilihan fasa gerak adalah penting untuk meningkatkan reproduksibilitas dan selektivitas pemisahan analit. Komposisi fasa gerak dalam kromatografi cair memberikan suatu eksperimen yang tidak dijumpai pada kromatografi gas<sup>17</sup>.

Menurut Edward dan Robert, fasa gerak yang digunakan mempunyai syarat-syarat antara lain murni, tidak terdapat kontaminan, tidak bereaksi dengan wadah (*packing*), harus sesuai dengan detektor yang digunakan, viskositas rendah, dan harganya wajar. Apabila syarat dari fasa – fasa gerak tersebut terpenuhi, maka akan memberikan hasil analisis yang baik.

Umumnya, semua eluen yang sudah digunakan langsung dibuang karena prosedur pemurniannya kembali sangat membosankan dan mahal biayanya. Menghilangkan gas (gelembung udara) dari eluen, terutama untuk KCKT yang menggunakan pompa bolak-balik sangat diperlukan terutama bila detektor tidak tahan kinerja sampai 100 psi. Udara terlarut yang tidak dikeluarkan akan menyebabkan gangguan besar di dalam detektor sehingga data yang diperoleh tidak dapat digunakan. Menghilangkan gas (*degassing*) juga sangat baik jika menggunakan kolom yang sangat sensitif terhadap udara<sup>4</sup>.

#### **2.7.4 Fasa Diam (Kolom)**

Kolom merupakan jantung kromatografi sebagai tempat terjadinya proses pemisahan. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok diantaranya kolom analitik dengan diameter dalam 2-6 mm, panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom, untuk kemasan pellicular, panjang yang digunakan adalah 50-100 cm, untuk kemasan poros mikropartikel, panjang yang digunakan adalah 10-30 cm. Kolom preparatif umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dengan panjang kolom 25-100 cm.

Kolom umumnya dibuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperature kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Pengepakan kolom tergantung pada model KCKT yang digunakan<sup>18</sup>.

Kolom dilapisi secara rapat oleh fasa diam yang merupakan partikel kecil padat dan berpori dimana materialnya memiliki ukuran partikel distribusi tertentu dan diameter pori yang spesifik untuk jenis fasa diam yang tergantung pada sifat dan tipe pemisahan yang diinginkan <sup>18</sup>.

### 2.7.5 Sistem Deteksi

Suatu detektor diperlukan untuk mendeteksi adanya komponen analit di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, selektifitas dan respon yang cepat terhadap semua analit serta memiliki kepekaan yang rendah terhadap fluktuasi aliran, ketidakmurnian dan gelembung udara pada fasa gerak <sup>10</sup>.

Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan rentang yang lebih luas. Komponen utama detektor UV adalah sumber cahaya, pemilih panjang gelombang dan *phototube*. Detektor juga dilengkapi dengan *flow cell* yang berhubungan langsung dengan kolom. Sinyal *output* dari *phototube* dikirim ke rekorder atau integrator, dimana absorbansi secara kontinu ditampilkan. Puncak dilaporkan sebagai penyerapan UV dari komponen yang terelusi dari kolom <sup>19</sup>.

Detektor UV dioperasikan untuk pendeteksian analit yang mempunyai serapan pada panjang gelombang UV. Fasa gerak atau eluen tidak boleh mempunyai panjang gelombang serapan UV agar diperoleh *baseline* yang stabil. Kesensitifan alat ini tergantung pada koefisien absorptivitas molar komponen analit. Analit dengan absorptivitas yang besar akan memberikan batas deteksi yang baik dibandingkan analit dengan absorptivitas yang lebih kecil <sup>15</sup>.

## 2.8 Validasi Metoda Analisis

Validasi adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu pada prosedur penetapan yang dipakai untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi dilakukan untuk menjamin

bahwa metoda analisis yang dilakukan akurat, spesifik, reprodusiabel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis<sup>20</sup>.

### 2.8.1 Kecermatan/ ketepatan

Kecermatan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dapat ditentukan dengan metoda penambahan baku (metoda adisi). Metoda adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa lalu dianalisis dengan metoda tersebut. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan<sup>20</sup>.

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{B}{A+C} \times 100\%$$

Keterangan : B = Konsentrasi sampel setelah adisi

A = Konsentrasi sampel

C = Konsentrasi analit yang ditambahkan

### 2.8.2 Ketelitian (*precision*)

Ketelitian diukur sebagai simpangan baku relatif (koefisien variasi). Ketelitian dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah ketelitian metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi yang sama dan dalam interval yang pendek. Ketertiruan adalah ketelitian metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda<sup>20</sup>.



## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Februari – Juli 2011 di Laboratorium Kimia Analisa Terapan Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam sebagai tempat persiapan larutan dan Laboratorium Sentral Universitas Andalas sebagai tempat pengukuran menggunakan KCKT dan Laboratorium Farmasi Universitas Andalas sebagai tempat pengukuran menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat KCKT (Shimadzu) dengan kolom C-18 (150 x 4,6 mm) dan detektor UV-Vis, pH.meter, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), neraca analitik, pengaduk ultrasonik, saringan filter eluen (0,45  $\mu\text{m}$ ) dan sampel (0,2  $\mu\text{m}$ ) serta peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan baku standar/pembanding asam benzoat, natrium sakarin, dan kafein, kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Natrium hidroksida (NaOH), Metanol *HPLC grade*, aquades ultra pure (UP), dan sampel minuman ringan.

### 3.3 Persiapan Sampel

Sampel minuman ringan dipilih berdasarkan merek yang beredar dipasaran supermarket kota padang. Empat merek minuman ringan dipilih untuk dijadikan sampel dalam penelitian ini.

### 3.4 Pembuatan Fasa Gerak

Fasa gerak dengan komposisi metanol : buffer fosfat pH 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 dengan beberapa variasi komposisi. Sebelum digunakan, metanol dan buffer fosfat disaring masing-masing melalui *membrane filters PTFE* 0,45  $\mu\text{m}$  dan *cellulose nitrate membrane filters* 0,45  $\mu\text{m}$ , lalu diawaudarakan sampai udara yang terlarut hilang menggunakan pengaduk ultrasonik.

### **3.5 Pembuatan Larutan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein**

Larutan induk 1000 mg/L asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dibuat dengan cara, 100 mg masing-masingnya dilarutkan dalam labu ukur 100 ml dan diencerkan dengan aquades ultra pure (UP) sampai tanda batas.

### **3.6 Penentuan Kondisi Optimum**

#### **3.6.1 Panjang Gelombang Optimum Secara Spektrofotometri UV**

Larutan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein 10 mg/L diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, lalu dibuat kurva serapannya. Kemudian ditentukan panjang gelombang optimum untuk analisis dimana ketiga senyawa memberikan serapan yang baik.

#### **3.6.2 Penentuan pH Buffer Fosfat Sebagai Komponen Fasa Gerak**

Campuran larutan asam benzoat, natrium sakarin, dan kafein diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam kolom KCKT dengan laju alir 1 mL/menit menggunakan fasa gerak campuran dari metanol dan buffer fosfat pH 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 dengan komposisi metanol : buffer fosfat (1 : 9) pada panjang gelombang analisis yang telah ditentukan sebelumnya. Kemudian ditentukan pH buffer fosfat yang menghasilkan pemisahan paling baik.

#### **3.6.3 Penentuan Komposisi Fasa Gerak Optimum**

Campuran larutan yang mengandung asam benzoat, natrium sakarin dan kafein diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam kolom KCKT dengan kecepatan alir 1 ml/menit menggunakan variasi komposisi fasa gerak (metanol : buffer fosfat) pada kondisi panjang gelombang optimum dan pH optimum yang telah ditentukan sebelumnya. Lalu ditentukan komposisi fasa gerak yang menghasilkan pemisahan yang paling baik dan waktu retensi yang lebih pendek.

### **3.7 Pembuatan Kurva Kalibrasi**

Campuran larutan yang mengandung asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dengan konsentrasi masing-masingnya dengan variasi konsentrasi 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, dan 80 mg/L diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam kolom

KCKT menggunakan kondisi optimum analisis yang telah ditentukan sebelumnya. Kurva kalibrasi dibuat berdasarkan konsentrasi (mg/L) dan luas puncak yang dihasilkan.

### 3.8 Penentuan kadar Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein dalam Sampel Minuman Ringan

Sebanyak 25 mL sampel minuman berkarbonasi dituangkan ke dalam beker gelas 50 mL, kemudian diawaudarkan sampai gelembung gas hilang. 2-5 ml sampel dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml dan diencerkan dengan fasa gerak sampai garis batas dan dihomogenkan. Sebanyak 20  $\mu$ L sampel diinjeksikan ke dalam kolom KCKT menggunakan kondisi optimum analisis yang telah ditentukan.

### 3.9 Penentuan Standar Deviasi Relatif

Campuran larutan yang mengandung asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dengan konsentrasi masing-masingnya 40 mg/L diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam kolom KCKT sebanyak 6 kali pengulangan menggunakan kondisi optimum analisis yang telah ditentukan sebelumnya. Standar deviasi relatif ditentukan berdasarkan luas puncak dan waktu retensi yang dihasilkan dengan menggunakan rumus :

$$\text{SDR} = \frac{S}{x} \times 100 \%$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Keterangan : SDR = Standar deviasi relatif

S = Standar deviasi/ simpangan baku

$\bar{x}$  = Nilai rata-rata

### 3.10 Penentuan Perolehan Kembali (Recovery)

Penentuan perolehan kembali dilakukan dengan menggunakan sampel yang telah diketahui konsentrasinya, kemudian dilakukan adisi standar dengan konsentrasi

tertentu. Dimana dipilih salah satu sampel yang akan ditentukan perolehan kembalinya yaitu diambil 3 ml sampel yang telah diawaudarakan sampai gelembung gas hilang dan dicampurkan dengan 3 ml campuran larutan standar yang konsentrasi masing-masingnya 100 ppm dan diencerkan sampai volume 10 ml. Kemudian diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L dengan 3 kali pengulangan. Persen perolehan kembali diperoleh dari perbandingan konsentrasi sampel setelah adisi dengan sejumlah konsentrasi standar dan sampel. Persen perolehan kembali dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ perolehan kembali} = B / (A+C) \times 100\%$$

Keterangan : B = Konsentrasi sampel setelah adisi

A = Konsentrasi sampel

C = Konsentrasi standar ditambahkan





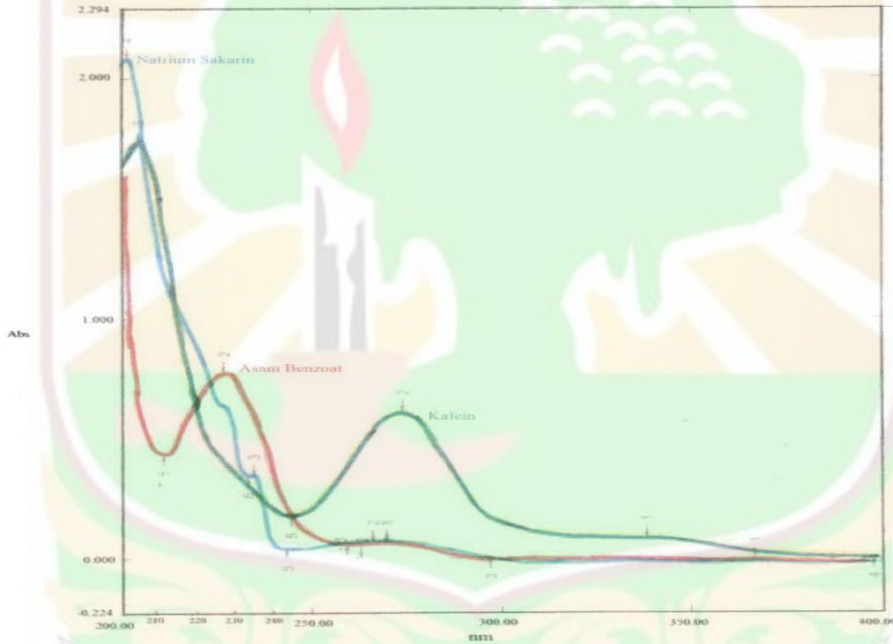
## BAB IV

### HASIL DAN DISKUSI

#### 4.1 Penentuan Kondisi Optimum Pemisahan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein

##### 4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum Secara Spektrofotometri UV

Penentuan panjang gelombang optimum atau panjang gelombang kompromis dari ketiga senyawa ini digunakan untuk melihat pada panjang gelombang berapakah senyawa asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dapat memberikan penyerapan yang baik sehingga pemisahan dapat digunakan pada metoda KCKT. Dari hasil pengukuran didapatkan panjang gelombang optimum yang dapat digunakan untuk pemisahan dengan metoda KCKT yang terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Spektrum UV Optimum Pemisahan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein dengan konsentrasi masing-masing 10 mg/L, dengan  $\lambda$  200-400 nm

Dari spektrum serapan Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein di atas dapat dilihat bahwa pada panjang gelombang 220 nm, masing-masing komponen dapat menyerap dengan baik sehingga panjang gelombang 220 nm dapat dijadikan sebagai panjang gelombang optimum pemisahan. Jika panjang gelombang optimum yang digunakan untuk pemisahan berada di bawah 220 nm, maka

serapan kafein akan menjadi kecil sedangkan jika panjang gelombang optimum pemisahan berada di atas 220 nm, maka serapan natrium sakarin dan asam benzoat akan menjadi kecil.

#### 4.1.2 Penentuan pH Buffer Fosfat Sebagai Komponen Fasa Gerak

Penentuan kondisi optimum pemisahan senyawa asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dilakukan pada pH 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 dan 6 yang masing-masing dengan komposisi fasa gerak metanol : buffer fosfat dengan adalah 10 : 90, yang dilakukan pemisahan dengan metoda KCKT pada panjang gelombang 220 nm dengan kolom C18 (150 x 4,6 mm i.d) dengan volume injeksi 20  $\mu$ L dan waktu retensi 30 menit. Dan hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pH buffer fosfat sebagai campuran fasa gerak terhadap waktu pemisahan asam benzoat, natrium sakarin, dan kafein dengan komposisi 10 : 90

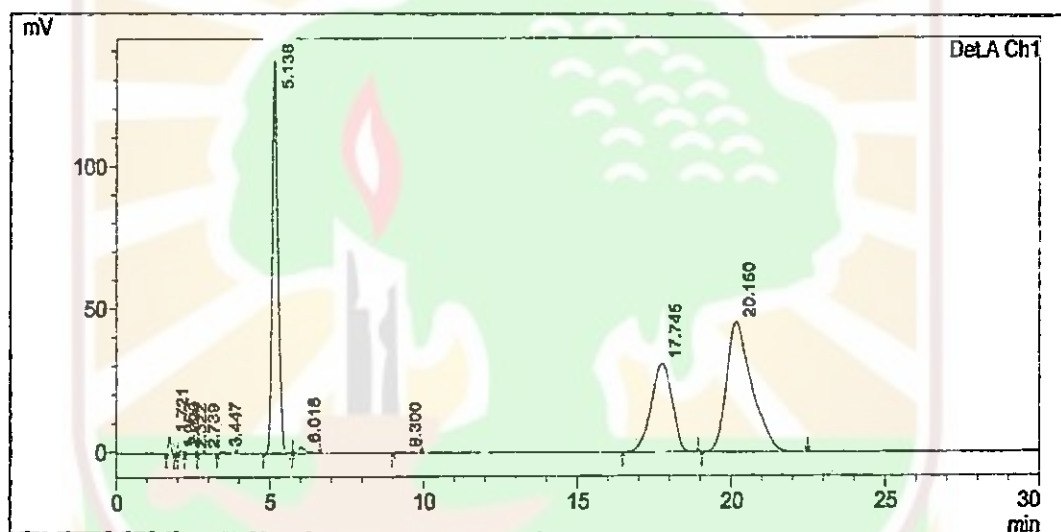
pH Buffer fosfat	Waktu Retensi (menit)		
	Natrium Sakarin	Asam Benzoat	Kafein
4,0	5,875	22,895	28,020
4,5	5,458	20,819	27,612
5,0	-	13, 189	23,917
5,5	-	-	-
6,0	-	-	-

Dari data pemisahan di atas berdasarkan waktu retensi didapatkan bahwa pH 4 dan 4,5 memberikan pemisahan yang baik ditandai dengan munculnya ketiga senyawa sedangkan pada pH 5 hanya muncul dua senyawa dan pada pH 5,5 dan 6 senyawa ini tidak muncul. Apabila dilihat berdasarkan waktu retensi, yang memberikan waktu retensi yang lebih cepat adalah pada pH 4,5. Oleh karena itu pH 4,5 dipilih sebagai pH yang baik untuk pemisahan.

### 4.1.3 Penentuan Komposisi Fasa Gerak Optimum

Dari Tabel 1, dapat diketahui bahwa pada komposisi Fasa gerak metanol dengan buffer fosfat pH 4,5 (10 : 90) telah terjadi pemisahan yang baik. Namun, ketiga senyawa ini masih mempunyai waktu retensi yang lama maka untuk jumlah metanol yang lebih sedikit tidak perlu dilakukan pengukuran.

Oleh karena itu jumlah metanol dinaikkan dan jumlah buffer dikurangi dengan komposisi fasa gerak 15 ; 85 ; 12,5 : 87,5 dengan panjang kolom (150 x 4,6 mm i.d) yang bertujuan untuk lebih menghemat waktu retensi dan didapatkan hasil pemisahan yang lebih baik dengan menggunakan metoda KCKT. Dari hasil pengukuran didapatkan kromatogram pemisahan optimum dengan komposisi 12,5 : 87,5 seperti Gambar 7 di bawah ini :



Gambar 7 : Kromatogram pemisahan asam benzoat, natrium sakarin, dan kafein pada variasi komposisi fasa gerak metanol: buffer fosfat 12,5 : 87,5 pH 4,5 ; kolom C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm) ; sistem deteksi UV 220 nm ; laju alir 1 mL/menit ; volume injeksi 20  $\mu$ L

Untuk membuktikan apakah senyawa yang muncul ini memang senyawa yang dipisahkan maka dilakukan injeksi masing-masing senyawa tersebut dan hasilnya dapat dilihat pada Lampiran 1.

Perbandingan waktu retensi dan luas puncak dari asam benzoat, natrium sakarin dan kafein pada berbagai komposisi fasa gerak metanol : buffer fosfat 15 : 85, 12,5 :87,5 dan 10 : 90 dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan waktu retensi dan luas puncak dari asam benzoat, natrium sakarin dan kafein pada berbagai komposisi fasa gerak metanol : buffer fosfat

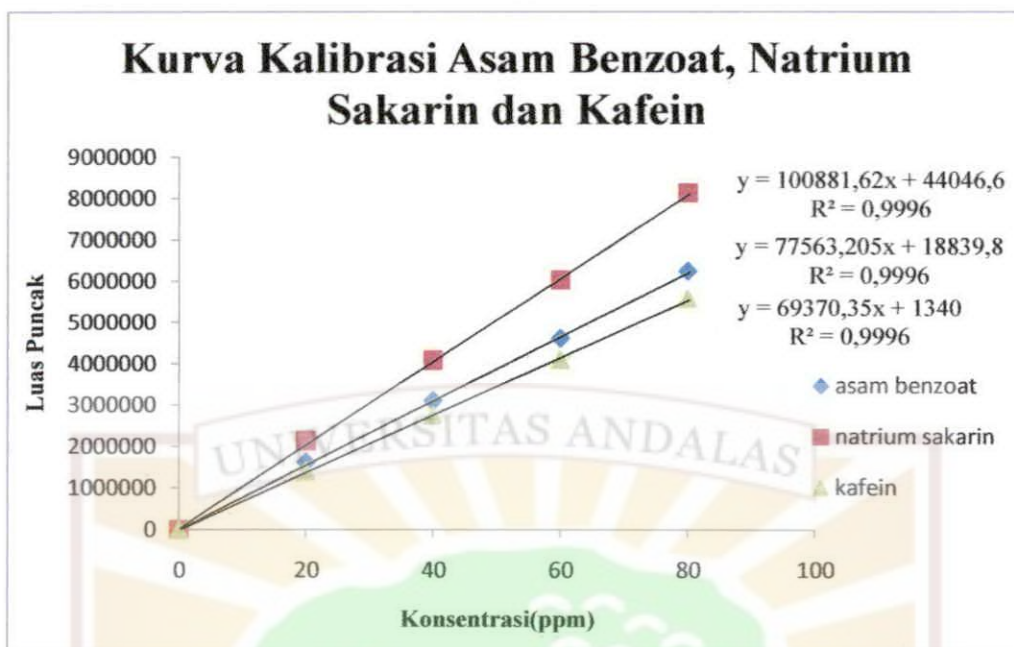
Fasa Gerak ( Metanol : Buffer Posfat pH 4,5)	Natrium Sakarin		Asam Benzoat		Kafein	
	Waktu Retensi	Luas Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak
10 : 90	5,458	1.844.744	20,646	1.455.891	27,612	2.628.229
12,5 : 87,5	5,138	1.779.567	17,745	1.438.102	20,150	2.583.290
15 : 85	4,385	1.838.255	14.848	4.128.347	-	-

Dari data terlihat bahwa waktu retensi yang lebih cepat adalah dengan komposisi campuran fasa gerak adalah 15 : 85, tapi puncak yang dihasilkan ada dua puncak padahal sebenarnya campuran senyawa didalamnya ada tiga. Hal ini terjadi karena bersatunya puncak antara asam benzoat dengan kafein yang dapat dilihat pada luas puncak yang naik dua kali lipat. Komposisi fasa gerak 10 : 90 dengan 12,5 ; 87,5 ternyata yang memberikan waktu retensi yang lebih cepat dan pemisahan yang lebih baik adalah komposisi campuran metanol dengan buffer fosfat adalah pada campuran 12,5 : 87,5. Oleh karena itu, komposisi fasa gerak 12,5 : 87,5 dipilih sebagai komposisi fasa gerak optimum untuk pemisahan natrium sakarin, asam benzoat dan kafein

#### 4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein

Hasil pengukuran deretan larutan standar asam benzoat, natrium sakarin dan kafein pada kondisi optimum pH 4,5 dengan campuran 12,5 : 87,5 dapat dilihat gambar kurva kalibrasi pada Gambar 8.





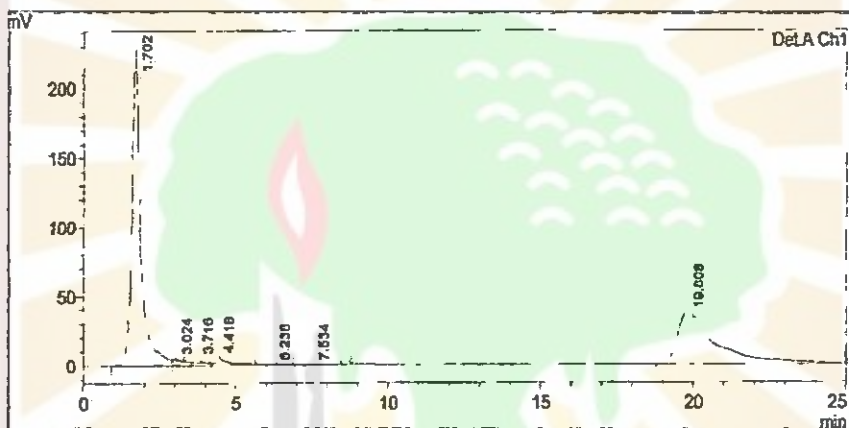
Gambar 8. Kurva kalibrasi beberapa konsentrasi larutan standar asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dengan luas puncak

Berdasarkan hasil pengukuran, didapatkan persamaan regresi dari asam benzoat adalah  $Y = 18839,8 + 77563,205x$  dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) = 0,9996. Persamaan regresi dari Natrium Sakarin adalah  $Y = 44046,6 + 100881,62x$  dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,9996. Persamaan regresi dari kafein adalah  $Y = 1340 + 69370,35x$  dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,9996. Menurut metoda AOAC nilai  $R^2$  (koefisien determinasi) yang didapatkan ini telah memenuhi standar yang ditetapkan, yaitu 0,9990<sup>21</sup>. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa telah terjadi hubungan yang linear antara konsentrasi asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dengan luas puncak yang didapatkan yang dibuktikan dengan garis lurus yang menghubungkan semua titik antara konsentrasi dengan luas puncak. Hasil perhitungan persamaan regresi asam benzoat, natrium sakarin, kafein dan koefisien determinasi dari masing-masing senyawa tersebut dapat dilihat pada Lampiran 2, 3 dan 4.

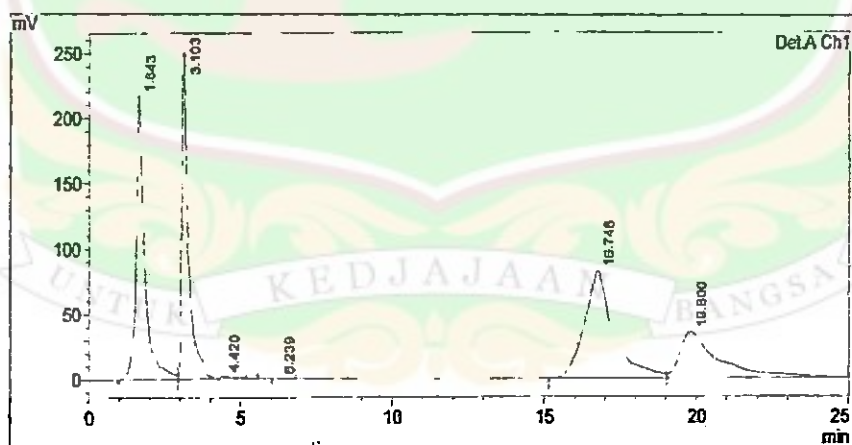
### 4.3 Penentuan Kadar Asam Benzoat, Natrium Sakarin dan Kafein dalam Sampel Minuman Ringan

Pada penentuan Asam benzoat, natrium sakarin dan kafein didalam sampel minuman ringan digunakan empat buah jenis sampel yang telah dilakukan perlakuan awal sebelum diukur dengan menggunakan metoda KCKT, dimana kondisi yang digunakan adalah kondisi optimum yang didapatkan yaitu dengan pH 4,5 dan komposisi fasa gerak 12,5 : 87,5 dimana sampel yang dipipet sebanyak 5 ml dan diencerkan sampai volume 10 ml. Kromatogram dari masing-masing sampel dapat dilihat pada gambar 9.

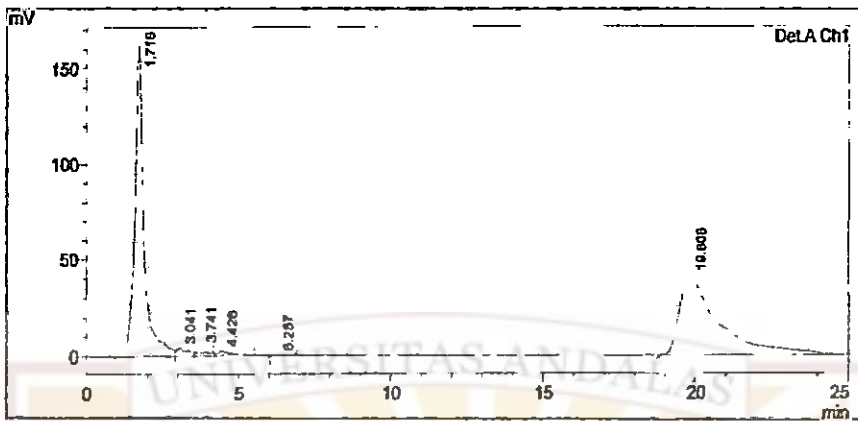
Sampel A



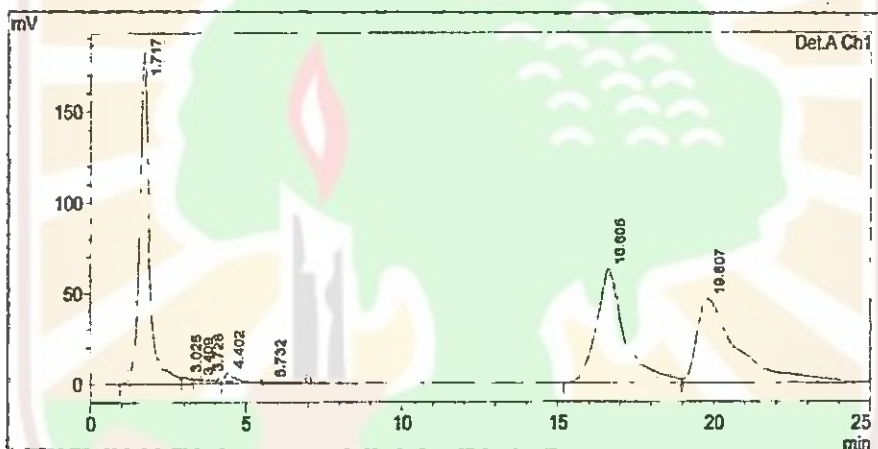
Sampel B



### Sampel C



### Sampel D



Gambar 9. Kromatogram masing-masing sampel yang diukur pada pH 4,5, panjang kolom (150x4,6 mm i.d), fasa gerak metanol - buffer fosfat ( 12,5 ; 87,5)

Data pengukuran empat jenis sampel yang diukur sebanyak dua kali, berdasarkan luas puncak dan besarnya konsentrasi masing-masing standar didalam sampel dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4 serta hasil perhitungan penentuan kadar asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dalam sampel minuman ringan dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 3. Data pengukuran empat jenis sampel berdasarkan luas puncak yang telah dirata-ratakan

Nama Sampel	Area		
	Na.Sakarin	As.Benzoat	Kafein
Sampel A	-	-	3.258.143,5
Sampel B	-	5.483.411	3.198.022,5
Sampel C	-	-	3.647.034
Sampel D	-	3.976.427,5	4.179.770,5

Tabel 4. Besarnya konsentrasi natrium sakarin, asam benzoat dan kafein di dalam sampel minuman ringan

Nama Sampel	Konsentrasi (mg/L)		
	Na.Sakarin	As.Benzoat	Kafein
Sampel A	-	-	93,89
Sampel B	-	140,91	92,16
Sampel C	-	-	105,11
Sampel D	-	102,05	120,47

Dari data pengukuran dan perhitungan pada semua sampel tidak terdapat Natrium sakarin sebagai pemanis buatan. Untuk Sampel B dan D terdapat Asam benzoat dimana kandungan yang paling tinggi terdapat pada sampel B yaitu 140,91 ppm sedangkan pada sampel D kandungannya adalah 102,05%. Untuk kafein sebagai pemberi efek stimulan bagi tubuh terdapat pada semua jenis sampel dimana kandungan yang paling tinggi terdapat pada sampel D yaitu 120,47 ppm sedangkan kandungan yang paling rendah pada sampel B sebesar 92,16 ppm. Kadar asam benzoat, natrium sakarin dan kafein yang ditemukan pada sampel semuanya tidak melebihi batas maksimum yang diizinkan yaitu berdasarkan SNI 01-0222-1995 untuk natrium sakarin dan asam benzoat serta SNI 01-6684-2002 untuk kafein.



#### 4.4 Penentuan Nilai Standar Deviasi Relatif (SDR) dari masing-masing Senyawa

Penentuan standar deviasi relatif (SDR) bertujuan untuk melihat ketelitian suatu metoda pada kondisi operasi yang sama dalam interval waktu yang tidak lama. Pada, penentuan nilai standar deviasi dari asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dilakukan pada konsentrasi 40 mg/L. Penentuan standar deviasi dari masing-masing standar dilakukan dengan enam kali pengulangan. Metoda yang dijadikan acuan dalam penentuan nilai standar deviasi ini adalah metoda AOAC dimana nilai standar deviasi untuk konsentrasi 40 mg/l yang berada dalam range 100 mg/l adalah kecil dari 5 %<sup>21</sup>.

Nilai standar deviasi relatif dari masing-masing senyawa ditentukan berdasarkan waktu retensi dan area seperti pada Tabel 5.

Tabel 5. Nilai Standar Deviasi Relatif Dari masing-masing senyawa

Jenis Standar	Waktu retensi			Luas puncak		
	Rata- rata	Simpangan baku	SDR	Rata- rata	Simpangan baku	SDR
Natrium sakarin	4,947	$8,222 \times 10^{-3}$	0,166%	3.758.153,5	7.825,849	0,208%
Asam Benzoat	16,933	0,062	0,365%	2.448.450	14.359,576	0,587%
Kafein	19,200	0,072	0,375%	2.979.723,167	17.810,473	0,598%

Dari Tabel 5 di atas, dapat diketahui bahwa nilai standar deviasi relatif yang diperoleh untuk natrium sakarin adalah 0,166% berdasarkan waktu retensi dan 0,208% berdasarkan area. Nilai standar deviasi relatif asam benzoat adalah 0,365% berdasarkan waktu retensi dan 0,587% berdasarkan area. Nilai standar deviasi relatif kafein adalah 0,375% berdasarkan waktu retensi dan 0,598% berdasarkan area. Nilai standar deviasi relatif yang diperoleh memenuhi syarat dari metoda AOAC yaitu lebih kecil dari 5,3% sehingga dapat dikatakan bahwa metoda ini sudah cukup teliti<sup>21</sup>. Hasil perhitungan standar deviasi relatif natrium sakarin, asam benzoat dan kafein dalam dapat dilihat pada Lampiran 6.

#### 4.5 Penentuan Perolehan Kembali (*Recovery*)

Penentuan perolehan kembali dilakukan bertujuan untuk mengetahui tingkat ketepatan metoda yang dilakukan dengan cara membandingkan konsentrasi sampel setelah adisi (penambahan) dengan sejumlah konsentrasi standar dan sampel. Nilai perolehan kembali menurut standar AOAC untuk konsentrasi yang berada didalam range 100 ppm adalah 90-107 % berarti menunjukkan tingkat kesesuaian dari rata-rata suatu pengukuran yang sebanding dengan nilai sebenarnya<sup>21</sup>. Hasil perolehan kembali dan perhitungannya untuk asam benzoat, natrium sakarin dan kafein dapat dilihat pada Tabel 6 dan Lampiran 7.

Tabel 6. Hasil Perolehan Kembali untuk asam Benzoat, natrium sakarin dan kafein

Jenis Standar	Perolehan Kembali (%)
Natrium Sakarin	94,925
Asam Benzoat	100,284
Kafein	90,317

Dari Tabel 6, didapatkan hasil pengukuran persen perolehan kembali untuk standar Asam benzoat adalah 100,824%, natrium sakarin adalah 94,925% dan kafein adalah 90,317%. Dari hasil persen perolehan kembali, nilai yang didapatkan memenuhi syarat metoda AOAC sehingga dapat dikatakan bahwa metoda ini memiliki ketepatan metoda yang cukup baik.

## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Kondisi optimum penentuan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein yang didapatkan adalah panjang gelombang 220 nm dengan pH optimum 4,5, dan komposisi fasa gerak metanol : buffer fosfat (1 : 7).

Jumlah asam benzoat, natrium sakarin dan kafein yang terkandung dalam masing-masing sampel tidak melebihi batas maksimum yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk natrium sakarin dan asam benzoat serta SNI 01-6684-2002 untuk kafein.

Nilai standar deviasi dari masing-masing standar berdasarkan waktu retensi dan area berturut – turut sebagai berikut asam benzoat 0,166% dan 0,208%, natrium sakarin 0,365% dan 0,587%, kafein 0,375% dan 0,598%. Nilai perolehan kembali dari masing-masing standar yaitu asam benzoat 94,925%, natrium sakarin 100,284%, dan kafein 90,317%. Hasil % SDR dan perolehan kembali ketiga senyawa ini memenuhi persyaratan metoda AOAC.

#### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk memperpendek waktu retensi dengan menggunakan “*Step Gradient Elution*”.



## DAFTAR PUSTAKA

1. F.G. Winarno. 1997. Kimia Pangan dan Gizi. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
2. W. Cahyadi. 2006. Analisis Dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan. Bumi Aksara.
3. Sianturi. Kafein dan Minuman Kesehatan. <http://www.gizi.net/>, 3 Desember 2001, diakses 13 Januari 2011.
4. L. Jhonson. Edward, R. Stevenson. 1991. *Basic Liquid Chromatograph*. Penerjemah K. Padmawinata. Dasar Kromatografi Cair. Bandung: ITB.
5. R. Widodo,. Mengenal Minuman Ringan Berkarbonasi (*Soft Drink*). <http://www.untag-sby.ac.id/>, 3 Juni 2008, diakses 13 Januari 2011.
6. Departemen Kesehatan R.I. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Farmakope Indonesia. 4<sup>th</sup>nd. Jakarta. 1995.
7. M. Kroger, K. Meister, and R. Kava. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of Safety Issues. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (CRFSFS)* Vol.5. Institute of Food Technologists. 2006.
8. Wilson and Gisvold. Textbook of Organic Medical and pharmaceutical Chemistry. Philadelphia: JB Lippincolt Company. 1982.
9. H. Mokhtar, and N. Ahmed.. Tea polyphenols: Prevention of cancer and optimizing health. *Am. J. Clin. Nutr., Suppl.*, 71 : 16985-17028. 2000.
10. D.H.Misra. B.K Mehta. M. Soni, D.C. Jain. Study of Extraction and HPTLC–UV Method for Estimation of Caffeine in Marketed Tea (*Camellia sinensis*) Granules. *International Journal of Green Pharmacy*: 2008. hal.47-51.
11. S.M. Khopkar. Konsep Dasar kimia Analitik. Penerjemah A. Saptorahardjo dan A. Nurhadi. Penerbit Universitas Indonesia, 2008. Hal 225 – 227.
12. R. D. Braun. Introduction to Instrumental Analysis. Louisiana: MC Graw Hill International. 1983.
13. M. Jacobson, How Soft Drinks are harming Americans health, 2000.. <http://www.karlloren.com/diet/p24.htm> hal 14 Januari 2011.pkl 20.00

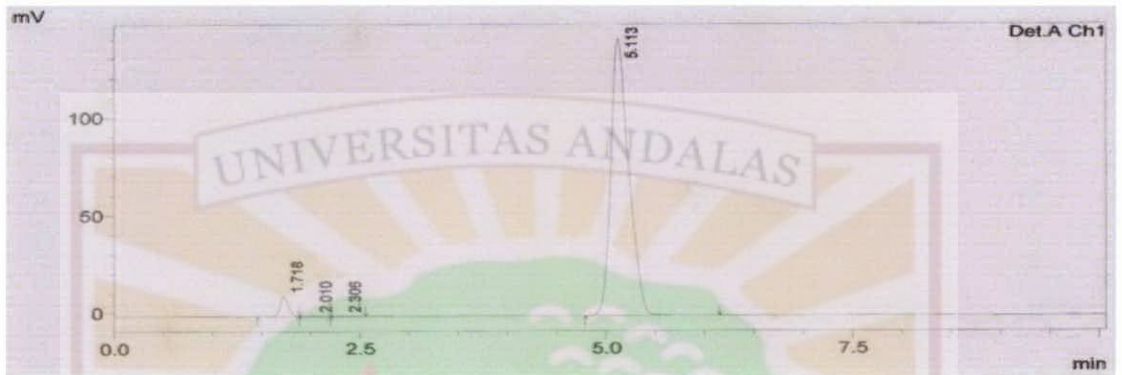


14. J. R. Gitter. M. J. Bobbit. and Schwarting. E. A. 1991. Penerjemah Padmawita. Kromatografi. Bandung: ITB.
15. Mulja. M. 1995. Analisis Instrumental. Bandung: ITB.
16. E. Heftman. Chromatography: Part A Fundamental and techniques. Amsterdam. Elsevier. 1992.
17. JR. R.A Day dan A.L. Underwood. 1989. Analisa Kimia Kuantitatif. Jakarta : Erlangga.
18. Subani. Penentuan Kadar Natrium Benzoat, Kalium Sorbat, dan Natrium Sakarin dalam Sirup dengan Metoda KCKT di Balai Besar Pengawasan Obat dan Makanan Medan. <http://www.library.usu.ac.id//>, Juli 2008, diakses 14 Januari 2011.
19. A. Mumin, F.A. Kazi, A. Zainal, H. Zakir. Determination and Characterization of Caffeine in Tea, Coffee, and Soft Drink by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography (SPE – HPLC). *Malaysian Journal of Chemistry*, 2006. 8: 45-51.
20. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metoda dan Cara Penghitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3) : 114 – 135. 2004.
21. Anonim. AOAC Guidelines for Single Laboratory, (**Error! Hyperlink reference not valid.**), 19/12/2002, diakses 02/07/2011.

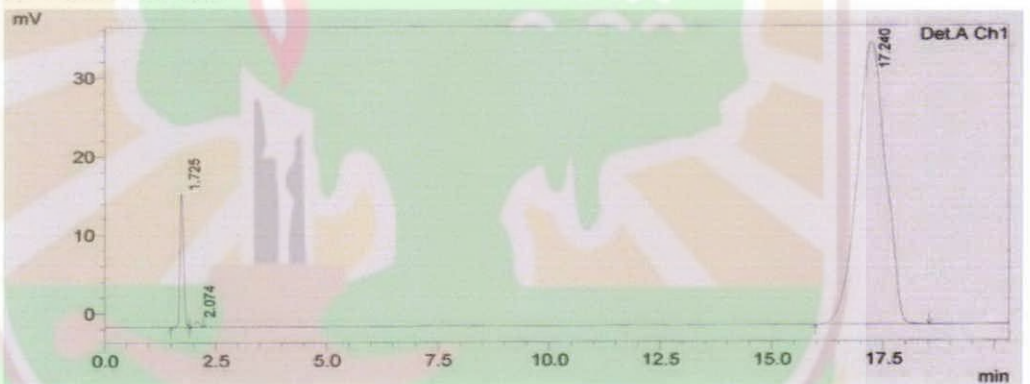
## Lampiran 1

Kromatogram pengujian masing-masing standar ( $\lambda$ :220 nm, Vol. Injeksi 20 $\mu$ l, fasa gerak metanol : buffer fosfat (12,5 : 87,5), kolom C18 (150 x 4,6 mm i.d)

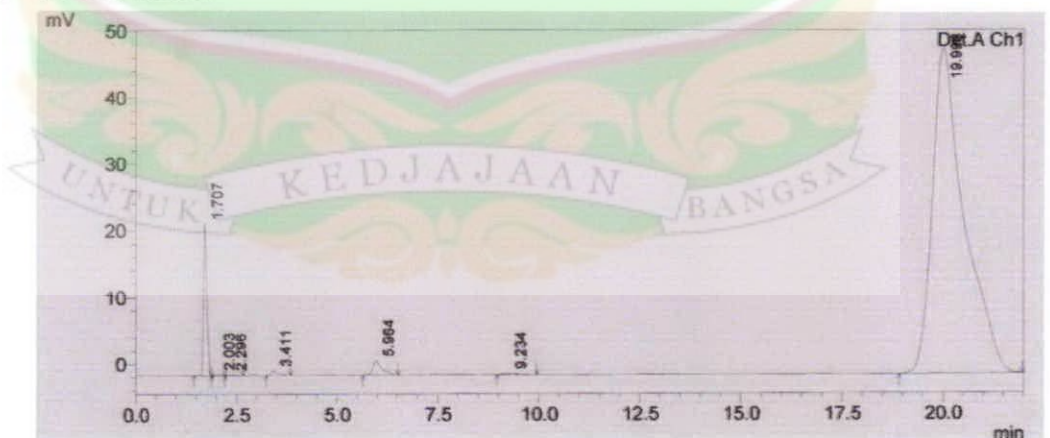
a. Standar sakarin



b. Standar Asam Benzoat



c. Standar kafein



## Lampiran 2

### Perhitungan persamaan regresi dan koefisien determinasi asam benzoat

X	y	xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>
0	0	0	0	0
20	1.620.694	32.413.880	400	2,6266.10 <sup>12</sup>
40	3.108.293	124.331.720	1600	9,6615.10 <sup>12</sup>
60	4.622.371	277.342.260	3600	2,1366.10 <sup>13</sup>
80	6.255.482	500.438.560	6400	3,9131.10 <sup>13</sup>

x = konsentrasi                      y = luas puncak

$$n = 200 \quad \Sigma x^2 = 12.000 \quad \bar{x} = 40$$

$$\Sigma x = 200 \quad \Sigma y^2 = 7,2786.10^{14} \quad \bar{y} = 3.121.368$$

$$\Sigma y = 15.606.840 \quad \Sigma xy = 934.526.420$$

$$B = \frac{n \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{n \cdot \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$A = \bar{y} - B \bar{x}$$

Persamaan regresi :

$$Y = 18.839,8 + 77.563,205x$$

Koefisien korelasi (r)

$$R = \frac{n \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{\sqrt{\{n \cdot \Sigma x^2 \cdot (\Sigma x)^2\} \{n \cdot \Sigma y^2 \cdot (\Sigma y)^2\}}}$$

$$= 0,9998$$

Koefisien determinasi (R<sup>2</sup>)

$$R^2 = 0,9998^2 = 0,9996$$

### Lampiran 3

#### Perhitungan persamaan regresi dan koefisien determinasi natrium sakarin

X	y	xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>
0	0	0	0	0
20	2.137.788	42.755.760	400	4,7254.10 <sup>12</sup>
40	4.082.213	163.288.520	1600	1,6664.10 <sup>13</sup>
60	6.039.000	362.340.000	3600	3,6469.10 <sup>13</sup>
80	8.137.556	651.004.480	6400	6,6219.10 <sup>13</sup>

x = konsentrasi                      y = luas puncak

n = 200                       $\Sigma x^2 = 12.000$                        $\bar{x} = 40$

$\Sigma x = 200$                        $\Sigma y^2 = 1,2392.10^{14}$                        $\bar{y} = 4.079.311,4$

$\Sigma y = 20.396.557$                        $\Sigma xy = 1.219.388.760$

Rumus Perhitungan

$$B = \frac{n \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{n \cdot \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$A = \bar{y} - B\bar{x}$$

Persamaan regresi :

$$Y = 44.046,6 + 100.881,62 x$$

Koefisien korelasi ( r )

$$R = \frac{n \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{\sqrt{\{n \cdot \Sigma x^2 \cdot (\Sigma x)^2\} \{n \cdot \Sigma y^2 \cdot (\Sigma y)^2\}}}$$

$$= 0,9998$$

Koefisien Determinasi (R<sup>2</sup>)

$$R^2 = 0,9998^2 = 0,9996$$



#### Lampiran 4

#### Perhitungan persamaan regresi dan koefisien determinasi kafein

X	y	xy	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>
0	0	0	0	0
20	1.426.966	28.539.320	400	2,0362.10 <sup>12</sup>
40	2.750.123	110.004.920	1600	7,5632.10 <sup>12</sup>
60	4.106.326	246.379.560	3600	1,6862.10 <sup>13</sup>
80	5.597.355	447.788.400	6400	3,1330.10 <sup>13</sup>

x = konsentrasi      y = luas puncak

n = 200       $\Sigma x^2 = 12.000$        $\bar{x} = 40$

$\Sigma x = 200$        $\Sigma y^2 = 5,7792.10^{14}$        $\bar{y} = 2.776.154$

$\Sigma y = 13.880.770$        $\Sigma xy = 832.712.200$

$$B = \frac{n \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{n \cdot \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2} =$$

$$A = \bar{y} - B\bar{x}$$

Persamaan regresi :

$$Y = 1340 + 69.370,35x$$

Koefisien korelasi ( r )

$$R = \frac{n \cdot \Sigma xy - \Sigma x \cdot \Sigma y}{\sqrt{\{n \cdot \Sigma x^2 \cdot (\Sigma x)^2\} \{n \cdot \Sigma y^2 \cdot (\Sigma y)^2\}}}$$

$$= 0,9998$$

Koefisien Determinasi (R<sup>2</sup>)

$$R^2 = 0,9998^2 = 0,9996$$

## Lampiran 5

### Data pengukuran empat jenis sampel dan hasil perhitungan kadar

Nama Sampel	Luas Puncak								
	Na.Sakarin			As.Benzoat			Kafein		
				1	2	Rata-rata	1	2	Rata-rata
Sampel A	-	-	-	-	-	-	3.303.063	3.213.224	3.258.143,5
Sampel B	-	-	-	5.365.700	5.601.122	5.483.411	3.254.094	3.141.951	3.198.022,5
Sampel C	-	-	-	-	-	-	3.684.143	3.609.925	3.647.034
Sampel D	-	-	-	4.011.907	3.940.948	3.976.427,5	4.205.347	4.154.194	4.179.770,5

Nama Sampel	Konsentrasi (mg/L)		
	Na.Sakarin	As.Benzoat	Kafein
Sampel A	-	-	93,89
Sampel B	-	140,91	92,16
Sampel C	-	-	105,11
Sampel D	-	102,05	120,47

Rumus Perhitungan :

$$\text{Persamaan regresi} \quad : \quad y = A + Bx$$

$$\text{Luas puncak} \quad = y \longrightarrow x = \frac{y-A}{B}$$

$$\text{Karena, faktor pengenceran (FP)} \quad = 2$$

$$\text{Maka, kadar sebenarnya} \quad = \text{FP} \times \text{Konsentrasi}$$

## Lampiran 6

### Perhitungan standar deviasi relatif natrium sakarin, asam benzoat dan kafein

Metoda AOAC Konsentrasi 40 ppm : SDR = < 5,3%

Pengulangan	Natrium Sakarin		Asam Benzoat		Kafein	
	Waktu Retensi	Luas Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak	Waktu Retensi	Luas Puncak
1	4,959	3.761.102	16,817	2.535.755	19,309	2.916.096
2	4,953	3.754.954	16,914	2.455.492	19,246	2.974.797
3	4,947	3.757.142	16,949	2.437.713	19,210	2.986.567
4	4,941	3.753.058	16,955	2.425.964	19,172	2.988.435
5	4,946	3.772.289	16,978	2.429.713	19,148	3.010.136
6	4,936	3.750.376	16,984	2.406.063	19,113	3.002.308
Rata-rata	4,947	3.758.153,5	16,933	2.448.450	19,200	2.979.723,167
Simpangan baku	$8,222 \times 10^{-3}$	7.825,849	0,062	14.359,576	0,072	17.810,473
SDR	0,166%	0,208%	0,365%	0,587%	0,375%	0,598%

Rumus Perhitungan :

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

$$SDR = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

## Lampiran 7

### Hasil perolehan kembali ( Recovery )

Berdasarkan metoda AOAC % recovery untuk konsentrasi < 100 ppm adalah 90 – 107%

Sampel yang kami gunakan adalah sampel no 4

Nama Komponen	Pengulangan	Luas Puncak	Konsentrasi Sampel Sebenarnya (ppm)	Konsentrasi Sampel Setelah Adisi (ppm)	Perolehan Kembali (%)	Perolehan Kembali Rata-rata (%)
Natrium Sakarin	1	2.886.789	30	28,179	93,929	94,925
	2	2.914.027	30	28,448	94,829	
	3	2.859.249	30	27,906	93,019	
Asam Benzoat	1	4.688.176	60,615	60,200	99,315	100,284
	2	4.750.403	60,615	61,003	100,640	
	3	4.762.473	60,615	61,158	100,896	
Kafein	1	4.140.668	66,141	59,669	90,215	90,317
	2	4.151.768	66,141	59,829	90,457	
	3	4.164.254	66,141	60,009	90,728	

Rumus Perhitungan :

$$\text{Persamaan regresi} : y = A + Bx$$

$$\text{Luas puncak} = y \rightarrow x = \frac{y-A}{B}$$

$$\text{Konsentrasi Sebenarnya} : M_2 = A$$

$$(V \cdot M)_1 = (V \cdot M)_2$$



Konsentrasi Sampel = B

Karena sampel yang dipipet sebanyak 3 ml dan dilarutkan sampai volume 10 ml maka,

$$B = \frac{3 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \cdot \text{konsentrasi sampel}$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{x}{A+B} \cdot 100\%$$



## Lampiran 8

Nilai %SDR dan perolehan kembali berdasarkan metoda AOAC<sup>21</sup>

Konsentrasi	Perolehan Kembali (%)
100 %	98 -101
10 %	95 – 102
1 %	92 – 105
0,1 %	90 – 108
0,01 %	85 – 110
100 µg/g (ppm)	90 - 107
10 µg/g (ppm)	80 – 115
1 µg/g (ppm)	75 – 120
10 µg/kg (ppb)	70 - 125

Konsentrasi	SDR (%)
100 %	1,0
10 %	1,5
1 %	2,0
0,1 %	3,0
0,01 %	4,0
100 µg/g (ppm)	5,0
10 µg/g (ppm)	6,0
1 µg/g (ppm)	8,0
10 µg/kg (ppb)	15,0

## Lampiran 9

**Batas maksimum penggunaan asam benzoat, natrium sakarin dan kafein  
Menurut SNI 01-0222-1995 untuk natrium sakarin dan asam benzoat dan  
SNI 01-6684-2002 untuk kafein.**

Berdasarkan SNI-6684-2002

No	Jenis Uji	Jenis bahan Makanan	Batas maksimum
1	Taurin	Minuman ringan	1000 mg/sajian
2	Kafein	Minuman ringan	50 mg/sajian

Berdasarkan SNI-01-0222-1995

No	Nama bahan Tambahan	Jenis bahan makanan	Batas maksimum
1	Aspartam	-	-
2	Natrium sakarin	permen	100 mg/kg
		Saus	300 mg/kg
		Es krim dan sejenisnya	200 mg/kg
		Minuman ringan	300 mg/kg
3	Asam benzoat	kecap	600 mg/kg
		Minuman ringan	600 mg/kg
		Saus tomat	1 g/kg