

# PENETAPAN KADAR KOFEIN DALAM MINUMAN BERENERGI YANG BEREDAR DI PASARAN DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Afdhil Arel<sup>1)</sup>, B.A. Martinus<sup>1)</sup>, Romi Nofiandri<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang

## INTISARI

Telah dilakukan penelitian tentang penetapan kadar kofein dalam minuman berenergi yang beredar dipasaran secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Minuman energi ini difraksinasi dengan kloroform. Hasil fraksi kloroform diuapkan dengan *rotary evaporator*. Kadar kofein diukur dengan kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom LC- 20AD dengan panjang 25 cm dan detektor SPD-20MAD dengan panjang gelombang 272nm. Fase gerak yang digunakan Metanol : Air (50:50) dengan laju alir 1 mL/menit. Dari hasil penelitian didapatkan kadar kofein dalam 1 botol sampel Kr =27,73 mg, M =34,14 mg, Pm=28,41 mg dan sampel Lv =69,78 mg. Hasil tersebut sampel Lv yang melebihi batas yang telah ditentukan oleh SNI No. 01-6684-2002 yaitu kurang dari 50 mg persaji.

**Kata Kunci : KCKT (Kromatografi cair kinerja tinggi, Koffein**

## ABSTRACT

*This research is telling about estimating amount of coffeine cosumption in energy drink which available in the market with HPLC method. Energy drink filtrat fractionated with chloroform and chloroform fractionation evaporated by rotary evaporator. Coffein amount measured by HPLC using column LC- 20 AD ( Length 20 cm ) and detector SPD – 20 MAD ( $\lambda$  272 nm) with mobile phase methanol : water (50:50). Amount estimating of coffein from this reseach in 1 bottle Sample Kr =27,7264 mg, M =34,140 mg, Pm=28,41 mg and sample Lv= 69,78 mg. The results sample Lv that exceed the limit set by SNI Num. 01-6684-2002 is less than 50 mg.*

**Keywords: HPLC(high performance liquid chromatography), Coffeine**

## PENDAHULUAN

Kesehatan merupakan keadaan sejahtera dari badan, jiwa dan sosial yang memungkinkan setiap orang hidup produktif secara sosial dan ekonomis. Dan upaya kesehatan adalah kegiatan untuk memelihara dan meningkatkan kesehatan yang dilakukan oleh pemerintah atau masyarakat. Setiap orang memiliki hak yang sama dalam memperoleh derajat kesehatan yang optimal. Dalam rangka

peningkatan derajat kesehatan masyarakat maka pemerintah telah mengusahakan berbagai cara dan upaya sebagaimana dijelaskan dalam Undang – Undang No. 23 tahun 1992, yaitu penyelenggaraan kesehatan sebagaimana dimaksudkan dalam pasal 10 yang dilakukan melalui beberapa kegiatan, dimana salah satu dari kegiatan itu adalah pengamanan makanan

dan minuman (Departemen Kesehatan, 1992).

Di kota Padang banyak dijual minuman berenergi yang sebagian besar pembeli atau pengguna minuman berenergi adalah para pengemudi kendaraan, khususnya para supir bus antar kota. Minuman berenergi memungkinkan para supir untuk selalu waspada saat berkendara, karena minuman berenergi dapat memberi efek tidak mudah lelah dan ngantuk, karena di dalam minuman berenergi terdapat komposisi kofein yang berperan sebagai zat aktif yang dapat menimbulkan efek tidak mudah ngantuk dan dapat menjaga stamina tubuh. Kofein sebagai zat stimulan tingkat sedang memang seringkali dituding sebagai penyebab kecanduan. Hal tersebut tidak sepenuhnya benar, kafein hanya dapat menimbulkan kecanduan jika dikonsumsi

dalam jumlah yang sangat banyak dan rutin. Namun kecanduan kafein berbeda dengan kecanduan obat psiktropika, karena gejalanya akan hilang dalam satu dua hari setelah konsumsi (Moore, 2001).

Pemerintah telah menetapkan standar kafein pada minuman berenergi yaitu SNI No 01-6684-2002 tentang minuman berenergi. Tujuan dari SNI tersebut adalah untuk melindungi konsumen dari efek negatif kafein yang berlebih. Namun disisi lain, konsentrasi kafein yang telah ditentukan tersebut tidak memberikan efek stamina yang instan bagi konsumen, sehingga dimungkinkan ada produsen yang meningkatkan kadar kafeinnya untuk menghasilkan efek yang cepat bagi pengkonsumsinya. Kadar maksimum pada minuman berenergi berdasarkan peraturan menurut SNI No 01-6684- 2002 yaitu 50 mg persaji (SNI, 2002).

Dari uraian tersebut penulis tertarik untuk melakukan penelitian apakah kandungan kafein dalam minuman berenergi kemasan botol yang beredar di daerah kota Padang memenuhi syarat atau tidak. Metode yang digunakan dalam penetapan kadar kafein pada minuman berenergi kemasan botol yang beredar di daerah kota Padang, yaitu menggunakan metoda kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Pemilihan Metode ini dikarenakan waktu analisis cepat, daya pisah baik memiliki kepekaan yang tinggi bisa untuk molekul besar dan kecil mudah untuk memperoleh kembali cuplikan (Johnson & Stevenson, 1991).

## **METODE PENELITIAN**

### **Bahan**

Minuman berenergi, etanol, reagen Parry, NH<sub>4</sub>OH pekat, asam klorida, kalium klorat, natrium sulfat, kloroform p.a, aquabidest, metanol p.a, kafein pembanding kimia.

### **Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi : HPLC SHIMADZU, UV- VIS *detector*, kolom vp ods C18 dengan panjang kolom 50 x 4,6, Volume injector (20 µL), timbangan analitik, labu ukur, pipet ukur, erlenmeyer, gelas piala, corong, pipet tetes, cawan penguap, batang pengaduk,

corong pisah, penyaring membrane milipore 0,22 mm, alat untuk menghilangkan gas yang terdapat dalam larutan (Branson 1800), *rotary evaporator*, kertas saring

## **PROSEDUR PENELITIAN**

### **Pengambilan Sampel**

Sampel yang diambil adalah Minuman berenergi dari merek Kr, Pm, Lv dan M yang beredar di pasaran kota Padang. Dari masing- masing produk diambil empat sampel dengan nomor batch, tanggal kadaluwarsa dan waktu produksi yang sama, sehingga sampel dianggap homogen.

### **Ekstraksi Kafein dalam Sampel**

Siapkan minuman berkafein seperti minuman berenergi, ambil sebanyak 50mL. Masukkan ke corong pisah dan difraksinasi dengan 4 x 25 mL kloroform selama 15 menit. Kloroform akan memisahkan kafein dari minuman, akan terbentuk 2 lapisan air dan kloroform. Kemudian lapisan kloroform dipisahkan, gabungkan hasil fraksinasi dari masing-masing kloroform. Tambahkan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat yang berfungsi sebagai pengikat air pada kloroform, kemudian disaring. Kloroform hasil saringan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* maka akan terbentuk ekstrak kental

### **Pembuatan larutan Standar**

Timbang 50 mg kafein standar, dilarutkan dengan air dalam labu ukur 100 mL, kemudian tambahkan aquabidest sampai tanda batas hingga didapatkan konsentrasi kafein standar 500 µg/mL.

### **Penentuan dan Pemilihan Kondisi Analisa**

- Panjang gelombang serapan maksimum  
Dibuat larutan standar kafein 15 µg/mL dengan melakukan pengenceran dari larutan standar 500 µg/mL. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometerdidapatkan panjang gelombang 272 nm.

- b. Fase gerak  
Fase gerak yang digunakan adalah methanol : air dengan perbandingan (50:50).
- c. Kecepatan alir  
Kecepatan alir yang digunakan adalah 0,8 mL/menit dan 1,0 mL/menit. Untuk pemilihan kondisi analisa, dibuat larutan standar kofein 30 µg/mL dengan melakukan pengenceran dari larutan standar kofein 500 µg/ml. Kemudian diinjeksikan larutan tersebut sebanyak 20 µL ke alat KCKT pada panjang gelombang maksimum, dengan kecepatan 0,8 mL/menit dan 1,0 mL/menit, dengan fase gerak metanol : air (50:50).

#### Pembuatan kurva kalibrasi

Dari larutan standar kofein dengan konsentrasi 500 µg/mL, dipipet 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 mL berturut-turut dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL, dicukupkan volumenya dengan fase gerak sampai tanda batas hingga diperoleh konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 µg/mL. Kemudian masing- masing konsentrasi diinjeksikan sebanyak 20 µL ke alat KCKT dengan kondisi analisa terpilih, lalu dianalisis hubungan antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram dan dicari persamaan regresi linearnya.

#### Validasi Metoda Analisis

- a. Linieritas  
Larutan standar dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 µg/mL diinjeksikan sebanyak 20 µl ke dalam sistem KCKT. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot konsentrasi dan luas puncak pada masing-masing konsentrasi. Harga koefisien korelasi (r) ditentukan dengan persamaan regresi linier :  
 $y = a + bx$ .
- b. Sensitifitas  
Sensitifitas ditentukan dari perhitungan nilai batas deteksi (BD) dan nilai batas kuantitasi (BK). Penentuan BD dan BK dihitung dari persamaan regresi kurva kalibrasi

yang diperoleh dan dari data simpangan baku.

- c. Presisi  
Larutan standar kofein dengan konsentrasi 40 µg/mL, dipipet 0,1 mL. Kemudian dimasukkan ke labu ukur 10 mL dan dicukupkan volumenya dengan fase gerak. Lalu saring dengan penyaring membrane milipore 0,22 mm dan diinjeksikan 20 µl ke sistem KCKT, dielusi dengan fase gerak yang. Percobaan dilakukan sebanyak 5 kali. Lalu dihitung simpangan baku dan koefisien variasinya (KV).

#### Penetapan Kadar Kofein

Ekstrak Sampel dicukupkan dengan methanol sampai 10 mL, di pipet 3 mL masukan dalam labu 10 mL cukupkan dengan methanol, sehingga terbentuk larutan ekstrak kemudian di pipet 2 mL encerkan dengan methanol dalam labu 50 mL, Hasil yang diperoleh diinjeksikan 20 µL ke alat KCKT. Kromatogram yang diperoleh dibandingkan dengan kromatogram baku pembanding dan kadarnya dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

Setelah dilakukan penelitian tentang penetapan kadar kofein dalam minuman berenergi secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), maka diperoleh hasil sebagai berikut :

1. Identifikasi kofein dalam sampel dengan menggunakan reagen Parry memberikan hasil negatif, reaksi murexid memberikan hasil yang positif, reaksi murexid memberikan warna merah keunguan yang menandakan adanya kofein dalam sampel.
2. Penentuan dan pemilihan kondisi analisa dilakukan pada fase gerak metanol : air dengan tiga perbandingan dan laju alir 0,8 dan 1 mL/menit. Pada laju alir 0,8 ml/menit dengan fase gerak metanol : air (20:80) diperoleh waktu retensi

kofein pada 7,454 menit dengan jumlah plat teoritis 17094.158 dan nilai HETP 8,775. Pada fase gerak metanol : air (70:30) diperoleh waktu retensi kofein 4,694 menit dengan jumlah plat teoritis 2075.508 dan nilai HETP 72,271 . Sedangkan untuk laju alir 1 ml/menit pada fase gerak metanol : air (50:50) diperoleh waktu retensi kofein lebih cepat 3,554 menit dengan jumlah plat teoritis 5416.594 dan nilai HETP 27,639 .

3. Pada pembuatan kurva kalibrasi dengan pelarut metanol menggunakan sederetan larutan standar (10, 20, 30, 40, dan 50  $\mu\text{g/mL}$ ) diperoleh persamaan regresi linear  $y = a + bx$ .
4. Untuk pengujian linearitas, berdasarkan perhitungan statistik regresi linier diperoleh nilai koefisien korelasi untuk baku kofein adalah 0,9995.
5. Untuk batas deteksi dan batas kuantitasi, dari hasil pengujian diperoleh batas deteksi kofein pada konsentrasi 1,806913532  $\mu\text{g/mL}$  dan batas kuantitasi pada konsentrasi 6,023045  $\mu\text{g/mL}$ .
6. Dari hasil uji presisi dengan baku kofein konsentrasi 40  $\mu\text{g/ml}$  diperoleh nilai simpangan baku 6,46510 dan KV 1,598%. Perhitungan kadar kofein dalam 1 botol (150 mL), Sampel Kr =27,73 mg, sampel M =34,14 mg, sampel Lv =69,78 mg, sampel Pm=28,41 mg

### Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan empat sampel minuman energi yang beredar di pasaran kota Padang pemilihan sampel ini dikarenakan banyak dikonsumsi oleh masyarakat, dan dikatakan juga memiliki kadar kofein yang tinggi .

Berdasarkan SNI tentang minuman energi , kadar kofein yang terdapat pada Minuman energi kurang dari 50 mg . Oleh karena itu perlu kiranya di lakukan penelitian untuk mengetahui dan menentukan kadar konsumsi kofein dalam Minuman energi. Untuk data pendukung dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif dari kofein

pada sampel minuman energi .

Untuk menarik kofein dalam minuman energi dilakukan fraksinasi dengan kloroform karena kofein larut dalam 6 bagian kloroform. Metoda fraksinasi ini dilakukan dalam corong pisah. Setelah fraksinasi selesai, seluruh fraksi kloroform digabungkan dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* . Proses penguapan berjalan dalam keadaan vakum sehingga kloroform dapat menguap dengan mudah, bahkan sebelum mencapai titik didihnya. Dengan demikian proses penguapan dapat berjalan lebih cepat dan juga dapat mengatasi kemungkinan rusaknya sampel karena pemanasan yang terlalu lama.

Analisis kofein secara kualitatif dilakukan dengan menggunakan reaksi murexid dan reagen Parry. Reagen Parry menggunakan kobal nitrat dalam metanol tidak memberikan warna hijau . Reaksi murexid akan memberikan warna merah violet bila di uap amoniak dan hilang dengan penambahan alkali kuat. Timbul nya warna ini karena adanya pemecahan oksidatif struktur purin.

Penetapan kadar konsumsi kofein pada penelitian ini dilakukan menggunakan metoda kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Metoda ini dipilih karena tidak memakan waktu yang cukup lama dan memiliki ketepatan dan ketelitian yang relatif tinggi (Rohman, 2009). Metoda kromatografi yang digunakan adalah fase terbalik, dimana fase diam yang digunakan adalah colom LC- 20 AD yang bersifat non polar dan fase geraknya metanol : air yang bersifat polar.

Pengukuran panjang gelombang maksimum kofein dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200-400nm dan diperoleh penjang gelombang serapan maksimum kofein dalam metanol pada 272 nm dengan nilai absorban 0,622. Panjang gelombang ini yang akan digunakan pada detektor pada KCKT.

Dalam kondisi pemilihan optimum ada beberapa faktor yang perlu di perhatikan, yaitu nilai efisiensi kolom (N), HETP, waktu retensi dan puncak kromatogram yang dihasilkan. Efisiensi kolom (N) adalah jumlah plat teori sedangkan HETP adalah tinggi setara lempeng teoritis. Kolom yang baik akan

mempunyai nilai N yang tinggi dan HETP yang rendah. Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom. Kromatogram yang baik memiliki waktu retensi yang pendek dengan puncak yang tajam dan tidak lebar serta pemisahan yang jelas. Berdasarkan data- data yang diperoleh untuk pemelihan kondisi optimum, fase gerak metanol: air ( 50 : 50) dengan laju alir 1 mL/menit memberikan hasil yang paling baik karena memiliki nilai N yang tinggi dan HETP yang rendah. Selain itu juga puncak yang dihasilkan tajam dan tidak lebar serta waktu retensi yang tidak terlalu lama yaitu, 3,554 menit, Waktu retensi ini tidak mutlak bahkan dapat bergeser, ini dapat terjadi karena beberapa hal yaitu perbedaan waktu retensi , lamanya menginjeksi, pemutaran *valve* dan pengupuan selektif dari fase gerak.

Validasi metoda analisis dilakukan untuk memastikan bahwa beberapa parameter metoda analisis yang digunakan memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan, terutama untuk menjamin bahwa metoda analisis tersebut memberikan hasil yang cermat dan handal sehingga dapat dipercaya. Parameter tersebut meliputi linearitas, batas deteksi, dan batas kuantitas.

Linearitas merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x) (Rohman, 2009). Berdasarkan perhitungan statistik regresi linear kurva kalibrasi diperoleh persamaan regresi linear  $y = 55904,9 + 57286,99x$ . Dengan koefisiensi korelasi ( $r$ ) = 0,9995. Nilai ( $r$ ) tersebut mendekati 1, menunjukkan bahwa kurva kalibrasi yang dibuat telah membentuk satu garis lurus linear.

Batas deteksi merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi dan memberikan respon yang signifikan, sedangkan batas kuantitas merupakan jumlah terkecil analit yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Dari hasil pengujian diperoleh batas deteksi pada konsentrasi 1,806913532  $\mu\text{g/mL}$  dan batas kuantitas pada konsentrasi 6,023045  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil pengukuran konsentrasi larutan sampel menunjukkan bahwa konsentrasi tidak melewati batas deteksi dan batas kuantitas. Sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang diperoleh dari

hasil pengukuran tidak memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Hasil pemeriksaan kadar kofein masing-masing sampel menggunakan persamaan regresi linier didapatkan kadar kofein dalam sampel minuman energi. Sampel Kr =27,73 mg, sampel M =34,14 mg, sampel Lv =69,78 mg, sampel Pm=28,41 mg

Dari penetapan kadar keempat jenis sampel tersebut, pada sampel Lv terdapat kadar kofein yang lebih tinggi melebihi batas yg telah ditentukan oleh SNI No. 01-6684-2002.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kadar kofein dalam 1 botol (150mL) sampel Kr =27,73 mg, M =34,14 mg, , Pm=28,41 mg dan sampel Lv =69,78 mg. Pada hasil tersebut sampel Lv yang melebihi batas yang telah ditentukan oleh SNI No. 01- 6684-2002 yaitu kurang dari 50 mg persaji.

### Saran

Pada peneliti selanjutnya disarankan untuk melakukan analisa kuantitatif kofein pada jenis bahan minuman lain dan kepada masyarakat terutama anak –anak dan orang dewasa sebagai konsumen agar tidak berlebihan dalam mengkosumsi minuman berenergi

## DAFTAR PUSTAKA

- Departemen Kesehatan, 1992. *Undang-Undang Tentang Kesehatan Nomor 23*. Jakarta
- Johnson, E. and L., Stevenson, R., 1991, *Dasar Kromatografi Cair*, Penerbit ITB, Bandung, 1-54.
- Moore, 2001, *Essensial Obstetri dan Ginekologi*. Edisi Dua. Jakarta.
- Rohman, A., 2009, *Kromatografi Untuk Analisis Obat*, Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Standar Nasional Indonesia, *Minuman Energi*, No. 01- 6684- 2002.