

# JURNAL KIMIA MULAWARMAN

Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl).

*Eva Marlina dan Chiril Saleh* (63-69)

Optimasi Kinerja Analitik Pada Penentuan Kafein Dengan Metode Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi.

*Anisa Sentosa Panggabean, Suhur P. Pasarithu, Nioma Vinanda dan Rita Haromi* (70-73)

Restrukturisasi Lemak Kakao Dengan Minyak Kemiri (*Chondria Nut Oil*) Menggunakan Lipase Kemiri Melalui Reaksi Interesterifikasi.

*Lilya Hilda* (74-79)

Sintesis dan Karakterisasi Humin-TiO<sub>2</sub> Menggunakan FT-IR dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

*Nurhas Hidayati dan Nova Yulianari* (80-82)

Uji Aktivitas Enzim Dehidrogenase Laktat (DHL) Yang Terenkapsulasi Dalam Silika dari Abu Sekam Padi.

*Nora Hendryanti* (83-88)

Modifikasi Zeolit Alam Menjadi Material Katalis Perengkahan.

*Suciati H. Silalahi, Alwin Simpar dan Endah Syakti* (89-93)

Pengaruh Penambahan Ekstrak Heksana Biji Kepayang (*Pongamia edule* R.) Terhadap Bilangan Peroksida Minyak Kelapa (*Cocos nucifera* L.) Yang Diolah Secara Tradisionil.

*Suhur P. Pasarithu, Eva Marlina, Herlina Magdalena dan Ratulina Sisaremare* (94-101)

Uji Perbandingan Aktivitas Vasodilatasi Secara In Vitro Pada Dua Jenis Tumbuhan Famili Akar-Kuning.

*Sarif Imani dan Khawadi Kowli* (102-108)

Sintesis Surfaktan Digliserida dan Monogliserida Melalui Reaksi Glisemolisis Metil Kaprat.

*Danul* (109-111)

Sintesis dan Karakterisasi Adsorben Tanah Diatom-2-Merkaptobenzotiazol.

*Ahmad Fauzi dan Nurhas Hidayati* (112-115)

Kandungan Kalsium Pada Daun dan Umbi Ubi Kayu.

*Alimuddin* (116-119)

**KIMIA FMIPA  
UNIVERSITAS MULAWARMAN**

Jurnal Kimia Mulawarman	Volume 8	No. 2	PP 63-119	Samarinda Mei 2011	ISSN 1693-5616
----------------------------	----------	-------	-----------	-----------------------	-------------------

**Pembina:**

Prof. Dr. H. Zamruddin Hasid, SE, SU  
(*Rektor Universitas Mulawarman*)

Drs. Sudrajat, SU  
(*Dekan FMIPA Universitas Mulawarman*)

**Editor Ahli:**

Prof. Dr. Maria Bintang (IPB),  
Prof. Dr. Hardjono Sastrohamidjojo (UGM), Dr.Ir. Prastawa Budi (Unhas),  
Prof. Dr. Ir. H. Achmad Ariffien Bratawinata, M.Agr. (Unmul),  
Prof. Dr. Ir. H. Bandi Suprptono, M.Agr (Unmul),  
Prof. Dr. Sipon Muladi (Unmul), Dr. Bohari, M.Si (Unmul),  
Dr. Saibun Sitorus, M.Si (Unmul), Dr. Asfie Maldi, M.Sc (Unmul),  
Ir. Edi Sukaton, M.Sc (Unmul), Dr. Aman S. Panggabean, M.Si (Unmul),  
Dra. Susan Gracia Arfan, Apt., M.Si (BPOM Kaltim)

**Editor Pelaksana:**

Alimuddin, Rudi Kartika, Rahmat Gunawan, Erwin, Subur P. Pasaribu

**Administrasi:**

Teguh Wirawan, Daniel, Chairul Saleh, Ritson Purba, Soerja Koesnarpadi

**Keuangan:**

Winni Astuti, Eva Marliana, Noor Hindryawati

**Distributor:**

Rita Hairani, Finqo Aprianto

**Alamat Redaksi:**

Kampus Unmul Gunung Kelua  
Jl. Barong Tongkok No. 4  
Tel (0541)749152 Fax (0541)749140 Samarinda 75123

**e-mail:** [jurnalkimiamulawarman@yahoo.co.id](mailto:jurnalkimiamulawarman@yahoo.co.id)

**Rekening:** Bank Muamalat an: Kimia FMIPA Unmul  
No. rek.: 9052266599

ISSN 1693-5616



9 771693 561604

# JURNAL KIMIA MULAWARMAN

Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat dan Metanol dari Buah Labu Air (*Lagenari siceraria* (Molina) Standl).

*Eva Marlina dan Chairul Saleh (63-69)*

Optimasi Kinerja Analitik Pada Penentuan Kafein Dengan Metode Kromatografi Cairan Kinerja Tinggi.

*Aman Sentosa Panggabean, Subur P. Pasaribu, Nisma Vinanda dan Rita Hairani (70-73)*

Restrukturisasi Lemak Kakao Dengan Minyak Kemiri (*Chandle Nut Oil*) Menggunakan Lipase Kemiri Melalui Reaksi Interesterifikasi.

*Lelya Hilda (74-79)*

Sintesis dan Karakterisasi Humin-TiO<sub>2</sub> Menggunakan FT-IR dan SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

*Nurlisa Hidayati dan Nova Yuliasari (80-82)*

Uji Aktivitas Enzim Dehidrogenase Laktat (DHL) Yang Terenkapsulasi Dalam Silika dari Abu Sekam Padi.

*Noor Hindryawati (83-88)*

Modifikasi Zeolit Alam Menjadi Material Katalis Perengkahan.

*Imelda H. Silalahi, Aladin Sianipar dan Endah Sayekti (89-93)*

Pengaruh Penambahan Ekstrak Heksana Biji Kepayang (*Pangium edule* R.) Terhadap Bilangan Peroksida Minyak Kelapa (*Cocos nucifera* L.) Yang Diolah Secara Tradisionil.

*Subur P. Pasaribu, Eva Marlina, Herlina Magdalena dan Ruttalina Simaremare (94-101)*

Uji Perbandingan Aktivitas Vasodilatasi Secara In Vitro Pada Dua Jenis Tumbuhan Famili Akar Kuning.

*Sjarif Ismail dan Khemasili Kosala (102-104)*

Sintesis Surfaktan Diglisierida dan Monoglisierida Melalui Reaksi Gliserolisis Metil Kaprat.

*Daniel (105-111)*

Sintesis dan Karakterisasi Adsorben Tanah Diatom-2-Merkaptobenzotiazol.

*Ahmad Fatoni dan Nurlisa Hidayati (112-115)*

Kandungan Kalsium Pada Daun dan Umbi Ubi Kayu.

*Alimuddin (116-119)*

**KIMIA FMIPA  
UNIVERSITAS MULAWARMAN**

Jurnal Kimia Mulawarman	Volume 8	No. 2	PP 63-119	Samarinda Mei 2011	ISSN 1693-5616
----------------------------	----------	-------	-----------	-----------------------	-------------------

## OPTIMASI KINERJA ANALITIK PADA PENENTUAN KAFEIN DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIRAN KINERJA TINGGI

### THE OPTIMIZATION OF ANALYTICAL PERFORMANCE FOR DETERMINATION OF CAFFEIN WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Aman Sentosa Panggabean, Subur P. Pasaribu, Nisma Vinanda, Rita Hairani

PS. Kimia F.MIPA Universitas Mulawarman  
Jln. Barong Tongkok No. 4 Kampus Gn. Kelua Samarinda  
Telp. 0541-749152

#### Abstract

The research about optimation of analytical performance for determination of caffeine by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method has been done. The optimal of result determination to obtain, the HPLC system has been optimized for the important parameters are composition of mobile phase, flow rate and eluen pH. The result of research shown that the optimum conditions to obtain from the research are composition of mobile phase methanol: water (70: 30), flow rate 0.5 mL / minute and eluent pH are 5 has been achieved. Based on the optimized condition, the analytical performance of this method has been performed for the determination of caffeine with HPLC method. The result of research shown reproducibility of this method as coefficient of variation percentage (% CV) was 1.8665 %, limit of detection was 33.1332 ppb. This result showed this method capable to application for the routine analysis of caffeine in samples.

**Keywords:** Caffeine, HPLC, analytical performance

#### A. PENDAHULUAN

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 berlebihan dapat membahayakan kesehatan (Hayun, 2004).

Penelitian tentang analisis kafein telah banyak dilakukan. Penentuan kadar kafein dalam campuran parasetamol, salisilamida dan kafein dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri UV (Wulandari dkk., 2010). Hasil penelitian ini menunjukkan terjadinya tumpang tindih (*overlapping*) spektra dari ketiga senyawa tersebut. Hal ini disebabkan karena ketiga senyawa itu dapat larut dalam pelarut yang sama yaitu etanol serta memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang yang berdekatan. Dalam penelitian Yamauchi dkk., (2007) kafein dapat dideteksi pada panjang gelombang 272 nm. Pada penelitian ini kadar kafein ditentukan dalam teh, melalui teknik ekstraksi pelarut menggunakan pelarut timah asetat dan kloroform pada proses ekstraksinya. Kelemahan metode ini selain pelarut yang digunakan dapat merusak lingkungan juga membutuhkan proses ekstraksi yang lama dan biaya yang mahal. Kafein juga dapat ditentukan menggunakan teknik analisis injeksi alir (*Flow injection analysis*, FIA), menggunakan kolom Si-C<sub>18</sub> dengan detektor fotometer-UV, menghasilkan suatu kinerja analitik yang sangat

baik dengan limit deteksi sampai satuan  $\mu\text{g/L}$  (Barrales *et al.*, 2002).

Metode lain untuk penentuan kafein yaitu dengan kromatografi kertas, tetapi metode ini sudah dianggap tidak modern dan tidak efisien sehingga penggunaan metode ini sudah jarang digunakan untuk analisis rutin (Kogan, 1953). Penentuan kafein secara umum menggunakan metode kromatografi cairan kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) karena dianggap metode tersebut sangat efektif, cepat dan akurat untuk analisis rutin.

Dalam penelitian ini akan dilakukan penentuan kadar kafein dalam beberapa minuman kemasan yang beredar di pasaran dengan metode HPLC. Untuk memperoleh hasil yang akurat akan dipelajari kondisi optimum penentuan kafein yang meliputi analisis kualitatif (waktu retensi), pengaruh komposisi pelarut/eluen, laju alir eluen, pH eluen dan kinerja analitik yang meliputi kebolehan, linearitas, batas deteksi dan pengaruh matriks, yang semuanya diharapkan dapat diaplikasikan untuk menentukan kafein dalam sampel dengan selektifitas dan sensitifitas yang tinggi.

#### B. METODOLOGI PENELITIAN

##### 2.1. Alat dan Bahan

###### 2.1.1. Alat

Seperangkat instrument *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) Agilen 1100 Series kolom Shim-Pack VP-ODS (i.d. 4,6 x 250 mm) dan

detektor UV, pompa vakum, pH-meter, labu ukur, pipet volume, beaker glass dan kertas saring whatman No.42.

### 2.1.2. Bahan

Standar kafein ( $C_8H_{10}N_4O_2$ ), buffer fosfat, metanol dan aquabides.

## 2.2. Optimasi Parameter Pengukuran HPLC

### 2.2.1. Penentuan Fasa Gerak Metanol:Air

Sebanyak 5  $\mu$ l larutan standar kafein diinjeksikan ke dalam injektor HPLC. Komposisi fasa gerak yang digunakan adalah metanol : air dengan perbandingan 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, dan 50:50.

### 2.2.2. Penentuan Laju Alir

Pada tahap ini digunakan komposisi fasa gerak yang optimum. Sebanyak 5  $\mu$ L larutan standar kafein diinjeksikan kedalam injektor HPLC, dengan berbagai laju alir berbeda yaitu 0,5; 0,8; 1; 1,25 dan 1,5 mL/menit.

### 2.2.3. Penentuan pH

Sebanyak 5  $\mu$ l larutan standar kafein diinjeksikan ke dalam injektor. Fasa gerak yang digunakan diatur pada berbagai variasi pH 3-8 dengan menggunakan buffer fosfat pada komposisi dan laju alir optimum yang diperoleh pada penelitian sebelumnya.

## 2.3. Optimasi Kinerja Analitik

### 2.3.1. Linearitas Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan memvariasikan konsentrasi larutan standar kafein 0,5; 0,8; 1; 2; 5; 8 dan 10 ppm, kemudian masing-masing diinjeksikan sebanyak 5  $\mu$ l ke dalam kolom pada kondisi optimum. Deteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 270 nm (Yamauchi, 2007 menyebutkan bahwa penentuan kafein pada  $\lambda=272$  nm). Direkam kromatogram dan dibuat kurva kalibrasi dari luas puncak, lalu dihitung persamaan regresi dan koefisien korelasi.

### 2.3.2. Keboleholangan

Sebanyak 5  $\mu$ L larutan standar kafein 0,5 ppm diinjeksikan kedalam kolom menggunakan fasa gerak dan kecepatan alir yang optimum, diulang sebanyak 7 kali, kemudian dicatat luas puncaknya.

### 2.3.3. Limit Deteksi

Limit deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signal yang signifikan dibandingkan dengan signal blanko (Panggabean *et al.*, 2010).

## C. PEMBAHASAN

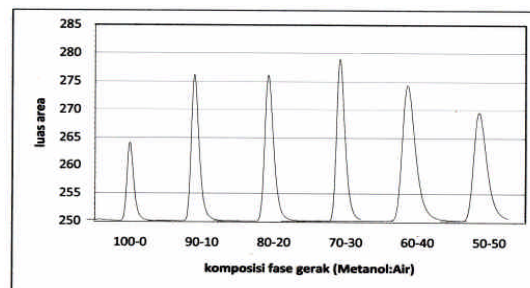
### 3.1. Optimasi HPLC

Kondisi kromatografi divariasikan untuk mendapatkan hasil analisis yang optimum. Kondisi kromatografi yang divariasikan adalah perbandingan fasa gerak metanol : air, laju alir eluen, dan pH eluen pada panjang gelombang 270 nm yang dilakukan secara bertahap. Penentuan hasil optimasi berdasarkan luas puncak kromatogram, karena luas puncak merupakan parameter yang lebih akurat untuk pengukuran kuantitatif (Ditjen POM, 1995).

#### 3.1.1. Optimasi Komposisi Fasa Gerak Metanol : air

Penelitian ini menggunakan kromatografi cairan fasa terbalik (reversed phase), yaitu fasa gerak yang digunakan lebih polar bila dibandingkan dengan fasa diam yang bersifat nonpolar. Untuk penentuan kafein

digunakan fasa gerak metanol dan air (IEW) karena kafein larut dalam metanol dan air. Fasa gerak selain berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fasa gerak dapat berinteraksi dengan solut-solut (Hendayana, 2006).



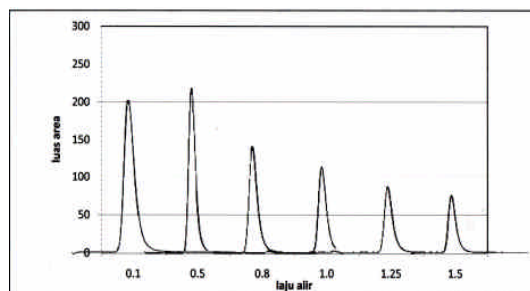
Gambar 1. Pengaruh komposisi fasa gerak

Pada Gambar 1. dapat dilihat bahwa pada komposisi fasa gerak (metanol:air) 70:30 menghasilkan luas area paling besar di bandingkan perbandingan komposisi yang lain karena pada komposisi tersebut kafein keluar melalui fasa diam secara maksimal. Mekanisme tersebut menggunakan kolom ODS (oktadesilsilan). Pada penambahan metanol akan menurunkan kepolaran fasa gerak sehingga proses elusi terjadi lebih cepat, oleh karena itu waktu retensi menjadi singkat (Martina, 2010). ODS merupakan fasa diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi (Rohman, 2009).

Rata-rata waktu interaksi molekul pada permukaan fasa diam tergantung pada energi interaksi (Bella, 2010). Fasa gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi. Daya elusi ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fasa diam dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fasa terbalik (fasa diam kurang polar daripada fasa gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Rohman, 2009).

#### 3.1.2. Optimasi Laju Alir Eluen

Laju alir dari fasa gerak (eluen) yang digunakan dalam tahapan kromatografi sangat berperan penting terhadap kinerja analitik yang dihasilkan.



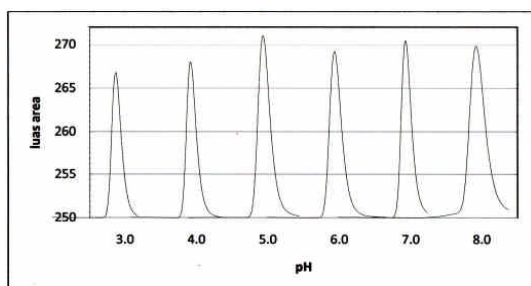
Gambar 2. Pengaruh laju alir eluen

Pada Gambar 2. dapat dilihat bahwa pada laju alir eluen 0,5 mL/menit menunjukkan hasil yang optimum karena memiliki puncak dengan luas area yang paling besar. Waktu retensi yang diperoleh tidak terlalu

lama yaitu berkisar 6 menit. Dari grafik tersebut dapat dilihat bahwa semakin cepat laju alir maka luas area yang dihasilkan semakin kecil serta waktu retensi yang diperoleh semakin cepat. Kecepatan laju alir tersebut membuat interaksi fasa gerak dan fasa diam menjadi singkat sehingga analit tidak keluar dari kolom secara optimal dari fasa diam akibat tekanan pompa yang mendorong fasa gerak mengalir lebih cepat. Hal ini mengakibatkan luas area puncak kromatogram lebih kecil pada laju alir lebih besar.

### 3.1.3. Optimasi pH Eluen

Optimasi pH eluen ditentukan dengan menggunakan komposisi fasa gerak dan laju alir optimum yang diperoleh sebelumnya. Pelarut organik seperti metanol dicampur dengan larutan *buffer* dalam air pada fasa gerak agar hasil yang diperoleh selektif dan kelarutan cuplikan tidak merusak kolom. Fasa gerak yang digunakan diatur pada variasi pH 3 - 8. Jika pH < 3, ikatan silika dapat terputus (terhidrolisis), dan jika pH > 8, silika akan larut, karena silika dapat larut dalam suasana basa (Panggabean *et al.*, 2009).



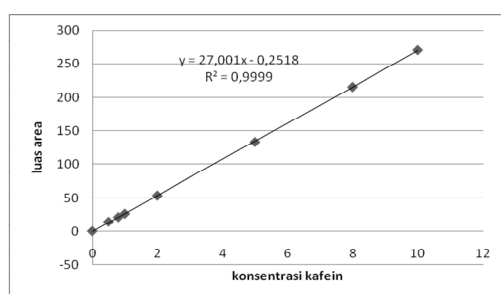
Gambar 3. Pengaruh pH eluen

Pada Gambar 3. dapat dilihat bahwa pH eluen memberikan perbedaan yang signifikan terhadap luas area standar kafein. Pada pH 5 menghasilkan luas area yang paling optimum di bandingkan lainnya.

## 3.2. Kinerja Analitik

### 3.2.1. Penentuan Kurva Kalibrasi

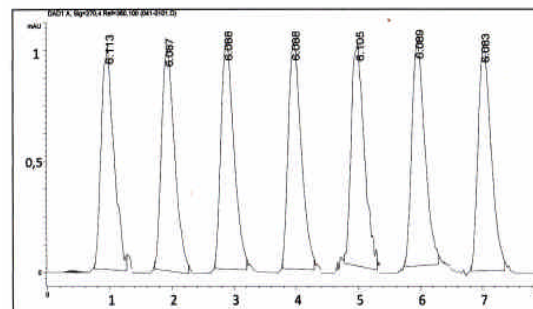
Kurva kalibrasi ditentukan berdasarkan luas area puncak pada konsentrasi standar kafein, kemudian masing-masing disuntikkan sebanyak 5 µl, diperoleh hubungan linearitas dengan koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9999 dan persamaan garis regresi  $Y = 27,001x - 0,2518$ .



Gambar 4. Kurva Kalibrasi

### 3.2.2. Kebolehlulangan

Kebolehlulangan ditunjukkan dengan % KV (koefisien variansi). Hasil pengukuran ditunjukkan pada Gambar 5. Dari hasil penelitian yang diperoleh, % KV untuk penentuan kafein 0,5 ppm adalah 1,8665 %. Koefisien variansi (KV) tersebut menunjukkan ketelitian dari suatu metode uji.



Gambar 5. Kebolehlulangan

### 3.2.3. Batas Deteksi (Limit of Detection)

Dari hasil penelitian, diperoleh batas deteksi untuk penentuan kafein dengan menggunakan metode HPLC adalah 33,1332 ppb. Hasil ini sangat baik, menunjukkan metode HPLC layak digunakan untuk analisis rutin.

## D. KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan :

- 4.1. Metode HPLC dapat digunakan sebagai analisis rutin penentuan kafein dalam sampel.
- 4.2. Beberapa optimasi yang dilakukan pada sistem HPLC dapat meningkatkan kinerja analitik pengukuran, ditunjukkan dari beberapa parameter penting yang semuanya menunjukkan keefektifan dan kesensitifan metode yang digunakan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Barrales, P.O., Weigand, R.P., and Diaz, A..M. 2002. *Simultaneous Determination of Paracetamol and Caffeine by Flow Injection-Solid Phase Spectrometry Using C18 Silica Gel as a Sensing Support*. Analytical Sciences 18. pp. 1241-1246.
2. Bella, L. 2010. *Optimasi Fase Gerak dan Laju Alir pada Penetapan Kadar Campuran Guaifenesin dan Dekstrometorfan HBr Dalam Sirup Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)*. Medan: Skripsi Fakultas Farmasi USU.
3. Ditjen POM. 1995. *Farmakope Indonesia edisi keempat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal 95-96.
4. Hayun, H.Y dan Citra N.A. 2004. *Penetapan Kadar sakarin, Asam Benzoat, Asam Sorbat, Kafeina, dan Aspartam di dalam beberapa Minuman Ringan Bersoda secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol I, No 3 Hal 148-159.
5. Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan*. Bandung: ROSDA.
6. Kogan, L. dan Frederick J.D. 1953. *Determination of Caffeine and Trigonelline in Coffee by Paper Chromatography*. New York: Journal the Fleischmann Laboratories of Standard Brands. Inc. Vol. 25, No 7.
7. Martina, A. 2010. *Optimasi Fase Gerak dan Laju Alir pada Penetapan Kadar Campuran Amoksisilin dan kalium Klavulanat dalam Tablet secara Simultan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)*. Medan: Skripsi Universitas Sumatra Utara.
8. Panggabean, A. S., Amran, M.B., Buchari and Achmad, S. 2009. *Speciation of Organotin Compounds with Ion pair-reversed phase Chromatography technique*. Eurasian Journal of Analytical Chemistry. 4(2). pp 215-225.
9. Panggabean, A. S., Amran, M.B., Buchari and Pasaribu, S.P. 2010. *Integrated Gas-Liquid Separator-Reactor for Determination Sn(II) at Trace Levels in Solution*. Yogyakarta: Indo. J. Chem. pp. 51-57.
10. Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
11. Wulandari, M.G.D., Regina dan Christine P. 2008. *Penetapan Kadar Kafein dalam campuran Parasetamol, salisil amida dan Kafein secara Spektrofotometri derivatif*. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
12. Yamauchi, Y, dan Akiko N. 2007. *Improved sample Pre-Treatment for Determination of Caffeine in Tea Using Cadridge Filled with PVPP*. Japan: Chem Pharm, Bull. pp. 1393-1396.