OPTIMASI METODE PENETAPAN KADAR KAFEIN PADA BEBERAPA SERBUK MINUMAN ENERGI YANG BEREDAR DI KOTA SERANG

Ita Inayah, Ginayanti Hadisoebroto, Mohamad Kashuri, Akhmad Kurnia

Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Al-Ghifari

ABSTRAK

Kadar kafein sesuai peraturan Kepala Badan POM tidak boleh melebihi 150 mg per hari. Penetapan kadar kafein dalam Farmakope Indonesia edisi V mempersyaratkan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Oleh karena itu Balai POM di Serang perlu melakukan uji verifikasi terhadap metode tersebut agar memenuhi persyaratan pengujian sesuai dengan kebutuhan. Tujuan penelitian ini adalah melakukan optimalisasi penetapan kadar kafein dalam serbuk minuman energi secara kromatografi cair kinerja tinggi dan untuk mengetahui kadar kafein dalam sampel serbuk minuman energi yang dijual di Kota Serang. Penetapan kadar kafein dilakukan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom : Oktadesilsilan (4,6 mm x 250 mm, ukuran partikel 5 μ m), fase gerak : Air-Metanol-Asam asetat glasial (69:28:3), laju alir : 1,0 mL/menit, laju penyuntikan 20 μ L, detektor : UV pada panjang gelombang 275 nm. Dilakukan verifikasi metode analisis dengan hasil Uji Selektivitas memenuhi persyaratan, Uji Presisi dengan RSD 3,827% (syarat 3,7-5,3 %), Uji Akurasi rata-rata perolehan kembali 98,80 % (syarat 90-107%), uji Linearitas dengan $Vx0=0,950$ (syarat $\leq 2,0$) dan $r=0,999678$ (syarat 0,995). Hasil pengujian sampel menunjukkan bahwa sampel pertama hingga sampel keempat tidak memenuhi persyaratan batas maksimum kafein dalam makanan dan minuman, sedangkan sampel kelima memenuhi persyaratan dengan kadar dibawah 50 mg.

Kata Kunci : Kafein, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Serbuk Minuman Energi.

ABSTRACT

Caffeine levels according to National Agency of Drug and Food Control regulation should not exceed than 150 mg per days. Determination of Caffeine levels according to 5th edition of Indonesian Pharmacopeia required using High Performance Liquid Chromatography method. Therefore, District Agency Drug and Food Control of Serang should utilize verification test to that method, to adjust with laboratory requirements as needed. The aims of this research are performing optimization of caffeine levels in energy drink powder using High Performance Liquid Chromatography and to discover caffeine levels in energy drink powder samples that distributed in Serang City. Caffeine levels assay performed by using High Performance Liquid Chromatography with Column : Octadecylsilane (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m particle size), mobile phase : Water-Methanole-Glacial acetic acid (69:28:3), flow rate : 1,0 mL/minute, Injecting Pace : 20 μ L, detector : UV in 275 nm wavelength. Verification of Analysis Method had performed which Selectivity test result meet requirement, Precision Test SDR is 3,827 % (requirement : 3,7-5,3%), Accuracy test with recovery rate is 98,80% (requirement : 90-107%), Linearity test result $Vx0=0,950$ (requirement $\leq 2,0$) and $r=0,999678$ (requirement : 0,995). Samples determination show that first until fourth samples do not meet the requirement of Caffeine Maximum Level in Food and beverages, while the fifth sample meets the requirements which its level under 50 mg

Key Words : Caffeine, High Performance Liquid Chromatography, Energy Drink Powder.

PENDAHULUAN

Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.00.05.23.3644 tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan Bab VIII

Pasal 18 ayat dua berbunyi : “Suplemen makanan dilarang mengandung bahan yang melebihi batas maksimum sebagaimana tercantum pada Lampiran 1 dan atau mengandung bahan yang ditetapkan

sebagaimana tercantum pada Lampiran 3". Dalam lampiran 3 dinyatakan bahwa kadar kafein tidak boleh melebihi 150 mg.

Kadar kafein sesuai peraturan Kepala Badan POM di atas tentu perlu dibuktikan secara ilmiah, oleh karenanya akan dilakukan Penetapan Kadar Kafein Pada Beberapa Serbuk Minuman Energi yang beredar di Kota Serang. Penetapan Kadar Kafein dalam Farmakope Indonesia edisi V mempersyaratkan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Namun dalam melakukan penentuan kadar Kafein harus menggunakan metode pengujian yang sesuai dengan kebutuhan pengujian yang dilakukan. (FI ed V hal 728-729).

Penetapan kadar menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dipilih karena: (1) sensitivitas detector : Detektor yang biasa digunakan dalam HPLC dapat mendeteksi kadar dalam jumlah nanogram (10^{-9} gram) dari bermacam-macam zat, (2) mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran (Adrian, 2013), mengingat sampel yang akan diuji mengandung matriks yang relatif banyak.

Metode yang dikembangkan laboratorium atau metode yang diadopsi oleh laboratorium dapat juga digunakan bila sesuai penggunaannya dan bila telah diverifikasi. Laboratorium harus memastikan bahwa dapat menggunakan metode standar dengan baik sebelum melakukan pengujian. Jika ada perubahan metode standar harus dilakukan konfirmasi ulang. (ISO 17025:2005, hal 18 & 19)

METODOLOGI

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat KCKT: Shimadzu Prominen LC 20, Autosampler: Shimadzu Prominent LC 20, kolom oktadesilsilan (4,6 mm x 250 mm, ukuran partikel 5 μ m): (Merck), Alat ultrasonik: Branson 8510, Timbangan analitik. Sampel berupa serbuk minuman energi, Baku Pembanding Kafein BPFI, Air, Metanol pro Analisis, Asam Asetat Glasial pro Analisis.

Membuat Larutan matriks sampel

Ditimbang 10 mg kafein, lalu dicampur dengan matriks sehingga campuran matriks menjadi 0,8 g. Diaduk hingga homogen dan dimasukkan ke labu ukur 100 mL dan larutkan dengan 50 mL air. Ultrasonik selama 10 menit dan encerkan dengan air sampai tanda. Pipet sejumlah 5,0 ml larutan ini ke dalam labu ukur

10 mL dan diencerkan dengan metanol sampai tanda

Cara penetapan

Lakukan kromatografi cair kinerja tinggi dengan kondisi sebagai berikut: kolom Oktadesilsilan (4,6 mm x 250 mm, ukuran partikel 5 μ m), fase gerak: Air-Metanol-Asam asetat glasial (69:28:3), laju alir: 1,0 mL/menit, laju penyuntikan 20 μ L, detektor: UV pada panjang gelombang 275 nm. Suntikkan dengan kondisi analisis seperti pada cara penetapan. Amati kromatogram.

Kriteria keberterimaan

- Tidak ada puncak pada kromatogram pelarut yang memberikan waktu retensi yang sama dengan larutan matriks sampel yang mengandung analit dan larutan baku.
- Puncak pada kromatogram larutan matriks sampel yang mengandung analit memberikan waktu retensi yang sama dengan puncak larutan baku
- Puncak kafein terpisah secara nyata dari puncak-puncak yang lain dengan resolusi > 1,5

Penetapan Presisi

Larutan Baku Induk dibuat dengan cara ditimbang secara seksama 5 mg kafein BPFI dimasukkan dalam labu tentukur 50 ml dan dilarutkan dengan 20 ml Air, disonikasi selama 10 menit dan encerkan dengan air sampai tanda. Larutan Baku Seri, dipipet larutan baku induk ke dalam labu tentukur 10 ml terpisah sebanyak 2,5 ml, 3,0 ml, 4,0 ml, 5,0 ml, 6,0 ml dan 7,5 ml kemudian encerkan dengan metanol hingga tanda, beri tanda larutan ini masing-masing B1, B2, B3, B4, B5 dan B6.

Penyiapan larutan Presisi

Ditimbang secara seksama 10 mg baku Kafein campur dengan matriks hingga campuran matriks menjadi 0,8 g. dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml dan larutkan dengan 50 ml air, ultrasonik selama 10 menit dan encerkan air hingga tanda. Pipet sejumlah 5,0 ml larutan ini ke dalam labu tentukur 10 ml dan encerkan dengan metanol sampai tanda. Saring larutan uji ini menggunakan penyaring membran 0,45 μ m. Lakukan 6 replikasi (larutan sampel 1 - 6)

Cara penetapan Presisi

Suntikkan secara berurutan larutan sampel 1-6 dan larutan seri Baku 1 - 6 dengan kondisi seperti pada cara penetapan uji selektifitas. Hitung masing-masing kadarnya dengan persamaan regresi kurva baku kafein dan hitung presisi dengan rumus HORRAT. Kriteria diterima jika RSD hitung $\leq$ RSD tabel.

Tabel 1.
Kriteria Keberterimaan Presisi

Zat Aktif (%)	Ratio Analit	Konsentrasi	RSD (%)
100	1	100	1,3
≥ 10	10^{-1}	10%	2,7
≥ 1	10^{-2}	1%	2,8
$\geq 0,1$	10^{-3}	0,1%	3,7
10^{-2}	10^{-4}	100 ppm	5,3
10^{-3}	10^{-5}	10 ppm	7,3
10^{-4}	10^{-6}	1 ppm	11
10^{-5}	10^{-7}	100 ppb	15
10^{-6}	10^{-8}	10 ppb	21
10^{-7}	10^{-9}	1 ppb	31

(Ludwig Huber, 2003)

Penetapan Akurasi

Ditimbang secara saksama setara 10 mg kafein yang diambil dari 10 bungkus serbuk yang telah dihomogenkan dan telah diketahui bobot rata-ratanya (sebagai 100%). Kemudian buat larutan untuk dosis lainnya yaitu 60%, 80%, 120% dan 140%. Masing-masing larutan dibagi lagi asalnya dari sampel 70 % dan baku kafein 30 %. Lakukan pengenceran bertingkat pada 100 mL lalu 0,5 ml dalam 10mL labu terukur. Dibuat 3 replikasi untuk setiap dosis. Disuntikkan larutan sampel secara berurutan dengan kondisi analisis seperti pada cara penetapan pada uji selektifitas. Hitung akurasi dengan perhitungan nilai % rekovery.

Kriteria keberterimaan Akurasi

Tabel 2.
Kriteria Keberterimaan Penetapan Akurasi

Zat Aktif (%)	Ratio	Konsentrasi	RSD (%)
100	1	100 %	98-102
≥ 10	10^{-1}	10 %	98-102
≥ 1	10^{-2}	1 %	97-103
$\geq 0,1$	10^{-3}	0,1 %	95-105
10^{-2}	10^{-4}	100 ppm	90-107
10^{-3}	10^{-5}	10 ppm	80-110
10^{-4}	10^{-6}	1 ppm	80-110
10^{-5}	10^{-7}	100 ppb	80-110
10^{-6}	10^{-8}	10 ppb	60-115
10^{-7}	10^{-9}	1 ppb	40-120

Prosedur Pengujian Sampel Serbuk Minuman Berenergi

Sejumlah serbuk dari 10 bungkus yang telah dihomogenkan dan telah diketahui bobot rata-ratanya ditimbang seksama setara ± 10 mg kafein. Dimasukan lama labu tentukut 100 ml dan dilarutkan dengan 50 ml air. Diultrasonik selama 10 menit dan diencerkan dengan air sampai tanda. Sejumlah 5,0 ml larutan ini dipipet ke dalam labu tentukur 10 ml dan diencerkan dengan metanol sampai tanda. Kemudian larutan masing-masing disuntikkan secara terpisah dan dilakukan KCKT sebagai berikut: kolom : Oktadesilsilan (4,6 mm x 250 mm, ukuran partikel 5 μ m), fase gerak : Air-Metanol-Asam asetat glasial (69:28:3), laju alir : 1,0 mL/menit, laju penyuntikan 20 μ L, detektor: UV pada panjang gelombang 275 nm. Kandungan kafein dalam serbuk minuman energi persaji

$$\frac{Lu - b}{a} \times \frac{Fu}{Bu} \times Br$$

Keterangan :

- Lu = luas Puncak Uji larutan uji
a = slope
b = intercept
Bu = bobot cuplikan yang ditimbang (mg)
Fu = faktor pengenceran larutan uji
Br = bobot rata-rata serbuk minuman suplemen (dalam mg)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 3.
Uji Kesesuaian Sistem

No	Waktu Retensi (Menit)	Area
1	5,983	3176522
2	5,969	3170109
3	5,958	3166186
4	5,948	3161787
5	5,942	3156589
6	5,936	3156857
Rata2 =	5,956	3164675
SD =	0,016134848	7153,180528
%RSD =	0,270900746	0,226032074

Hasil : RSD < 2 %, kesimpulan uji kesesuaian sistem memenuhi syarat

Gambar 1.
Kromatogram Larutan Fase Gerak

Larutan Matriks Sampel

Nama Sampel : Matriks
 Penguji : A. Kurnia
 Sample ID : Matriks
 Method File Name : PK Kofein.lcm
 Batch File Name : batch kafein2.lcb
 Data File Name : Matriks.lcd
 Data Acquired : 8/26/2015 3:23:31 PM
 Data Processed : 8/30/2015 9:03:21 PM

Gambar 2. Kromatogram Matriks

Gambar 3.
Kromatogram UKS Baku Kafein

Pelarut dan matriks menunjukkan puncak pada waktu yang berbeda dengan kafein, yaitu antara 2-3 sedangkan kafein antara 5-7. Dan tidak ada puncak pada kromatogram pelarut dan larutan matriks sampel yang memberikan waktu retensi yang sama dengan baku lalu puncak kafein terpisah secara nyata dari puncak yang lain dengan resolusi > 1,5. Jadi metode analisis tersebut memenuhi persyaratan selektivitas.

Penetapan Presisi

Tabel 4.
Data Pengukuran Baku untuk Penetapan Presisi

No	Kadar Baku (µg/ml)	Area
1	25,135	1523910
2	30,162	1844976
3	40,216	2242298
4	50,27	3129553
5	60,324	3970209
6	75,405	4643488
	Intercept	-148790,8692
	Slope	64818,47742
	R ²	0,99326742

Dibuat terlebih dahulu kurva baku kafein dari satu seri larutan baku kafein BPFI (99,04%)

yang terdiri dari enam konsentrasi dalam rentang 25% - 100%

Gambar 4.
Kurva Baku Kafein untuk Penetapan Presisi

Diperoleh persamaan $y = 64818x - 148791$.

Tabel 5.
Data Penetapan Presisi

No	Bobot Zat (g)	Area	Kadar Kofein (µg/ml atau ppm)
1	0,7507	2462360	40,28405129
2	0,7511	2574597	42,01561002
3	0,7719	2655939	43,27052996
4	0,7720	2675998	43,57999419
5	0,7880	2707157	44,06070588
6	0,7921	2762742	44,91825456
		Rata-rata	43,02152432
		SD	1,646632836
		RSD%	3,827462793

Kadar kafein rata-rata = 43,0125 ppm maka syarat keberterimaan ada di 3,7 s/d 5,3 (Ludwig Huber, 2003). RSD hasil pengukuran ada di 3,827% maka penetapan presisi memenuhi syarat keberterimaan

Penetapan Akurasi

Sebelum dilakukan pengukuran akurasi, dibuat satu seri larutan baku kafein BPFI (99,04%) yang terdiri dari enam konsentrasi dalam rentang 25%-100% terhadap konsentrasi larutan baku dengan hasil sebagai berikut

Tabel 6.
Data Pengujian Baku untuk Penetapan Akurasi

No	Kadar Baku (µg/ml)	Area
1	25,445	1484112
2	30,534	1847246
3	40,712	2473775
4	50,890	3053698
5	61,068	3667838
6	76,335	4558312
	Intercept	377,1075
	Slope	59942728
	R	0,99974

Gambar 5.
Kurva Baku untuk Penetapan Akurasi

Contoh (sampel) mengandung kafein 50,82 mg per saji (hasil penetapan kadar dengan bobot rata-rata contoh = 3,9963 g per sachet. Pada tabel perhitungan akurasi, menunjukkan rata-rata nilai perolehan sebesar 98,80% dengan kriteria penerimaan ada pada rentang perolehan kembali sebesar 90-100% (Ludwig Huber, 2003). Penetapan akurasi memenuhi syarat keberterimaan

Linearitas

Gambar 6.
Kurva Penetapan Linieritas

Pengujian kadar sampel

Gambar 7. Hasil Penetapan Kadar Sampel Serbuk Minuman Berenergi

Sesuai SK Ditjen POM nomor PO.04.02.3.01510 tahun 1996 tentang Batas Maksimum Kafein dalam Makanan dan Minuman adalah 50 mg / 150 ml, maka kadar kafein sampel kesatu hingga keempat melebihi 50 mg, tidak memenuhi persyaratan. Untuk sampel kelima memenuhi persyaratan karena kadarnya di bawah 50 mg, seperti yang terlihat dalam tabel berikut

Tabel 10.

Hasil perhitungan kadar sampel

Sampel	Kadar tiap saji (mg)	Hasil
Sampel ke-1 ulangan 1	54,42494884	>50 mg, TMS
Sampel ke-1 ulangan 2	54,41179695	
Sampel ke-2 ulangan 1	49,48560677	>50 mg, TMS
Sampel ke-2 ulangan 2	52,16331163	
Sampel ke-3 ulangan 1	57,93281573	>50 mg, TMS
Sampel ke-3 ulangan 2	55,21873838	
Sampel ke-4 ulangan 1	51,62273267	>50 mg, TMS
Sampel ke-4 ulangan 2	50,92451804	
Sampel ke-5 ulangan 1	45,10098441	Memenuhi Syarat
Sampel ke-5 ulangan 2	46,32338038	

SIMPULAN

Metode yang digunakan setelah melewati verifikasi metode analisis yang meliputi parameter selektifitas, presisi, akurasi dan linearitas memenuhi persyaratan. Sampel pertama hingga sampel keempat tidak memenuhi persyaratan kadar sebagaimana SK Ditjen POM Nomor PO.04.02.3.01510 tahun 1996 tentang Batas Maksimum Kafein dalam Makanan dan Minuman, sedangkan sampel kelima memenuhi persyaratan dengan kadar dibawah 50 mg

DAFTAR PUSTAKA

Anonim., 2014., *The United States Pharmacopeia*, 36th ed., The National Formulary, 31th ed., United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville

Anonim., 2014., *Waspadaai Keracunan Kafein dalam Minuman Berenergi.*, (<http://ik.pom.go.id/v2014/artikel/Waspadaai-Keracunan-Kafein-dalam-Minuman-Berenergi.pdf>)

- Anonim., 2007., ***How To Meet ISO 17025 Requirements For Method Verification.***, AOAC International, USA
- Anonim., 2008., **Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi (ISO/IEC 17025:2005, IDT).**, Badan Standarisasi Nasional., Jakarta
- Chung Chow Chan, Y.C. Lee, Herman Lam & Xue Ming Zhang., 2004., ***Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification.***, Wiley-Interscience., New Jersey.
- David G.Watson., 1999., ***Pharmaceutical Analysis A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.***, Churchill Livingstone., London-UK
- Harmita., 2004., **Majalah Ilmu Kefarmasian Volume I No 3 Review Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya.**, Departemen Farmasi FMIPA-UI., Jakarta
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia., 2014., **Farmakope Indonesia Edisi V**, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia., Jakarta
- Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.23.3644 **tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan**(http://www.pom.go.id/public/ukum_perundangan/pdf/final%20kep_lampiran.pdf)
- Lloyd R. Snyder, Joseph J.Kirkland & Joseph L. Glaich., 1997., ***Practical HPLC Method Development***, Wiley-Interscience., New York
- Lloyd R. Snyder, Joseph J.Kirkland & John W. Dolan., 2010., ***Practical HPLC Method Development***, A John Wiley and Son Inc. Publication., New Jersey
- Ludwig Huber., 2003., ***Pharmaceutical Process Validation : An International Third Edition***, Marcel Decker Inc., Waldbronn.
- Moffat, A. C., M. David Osselton, Brian Widdop (Eds)., 2011., ***Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th ed.***, The Pharmaceutical Press, London.
- Satinder Ahuja & Michael W. Dong., 2005., ***Handbook of Pharmaceutical Analysis By HPLC.***, Elsevier Academic Press, Amsterdam
- Satinder Ahuja & Henrik Rasmusen., 2007., ***HPLC Method Development For Pharmaceuticals.***, Elsevier Academic Press., London
- SK Ditjen POM Nomor PO.04.02.3.01510 tahun 1996 tentang **Batas Maksimum Kafein dalam Makanan dan Minuman**
- Stavros Kromidas., 2004., ***Practical Problem Solving in HPLC.***, WILEY-VCH., Saarbrücken