

**DIPA REGULER-UNP**

**LAPORAN PENELITIAN**



**PENENTUAN KADAR SAKARIN DAN KAFEIN PADA  
BEBERAPA MINUMAN *SOFT DRINK* SECARA HPLC**

Oleh:

**Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si  
Edi Nasra, S.Si, M.Si**

**Penelitian ini dibiayai oleh :  
Dana DIPA Tahun Anggaran 2011  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penelitian  
Nomor: 332/UN35.2/PG/2011  
Tanggal 19 Juli 2011**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2011**

fdk

**DIPA REGULER-UNP**

PERPUSTAKAAN UNP NEGERI PADANG  
TELAH TERDAFTAR

**LAPORAN PENELITIAN**

JUDUL : PENENTUAN KADAR SAKARIN DAN KAFEIN ...

PENYUSUN : DESY KURNIAWATI

JENIS : LAPORAN PENELITIAN

NOMOR : 79/UN.35.12/PR/11/2011

TANGGAL : 09 APRIL 2012



**PENENTUAN KADAR SAKARIN DAN KAFEIN PADA  
BEBERAPA MINUMAN *SOFT DRINK* SECARA HPLC**

Oleh:

**Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si**  
**Edi Nasra, S.Si, M.Si**

Penelitian ini dibiayai oleh :  
Dana DIPA Tahun Anggaran 2011  
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penelitian  
Nomor: 332/UN35.2/PG/2011  
Tanggal 19 Juli 2011

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2011**

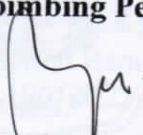


## HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN

1. Judul Penelitian : **Penentuan kadar sakarin dan kafein pada beberapa minuman *soft drink* secara HPLC**
2. Bidang Penelitian : MIPA (Kimia)
3. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : **Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si**
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP : 19751122 200312 2 003
  - d. Disiplin Ilmu : Kimia Analitik
  - e. Pangkat/Golongan : III-c / Penata
  - f. Jabatan : Lektor
  - g. Fakultas/Jurusan : Kimia / FMIPA
  - h. Alamat : Jl. Hamka, Kampus UNP Air Tawar Padang
  - i. Telp/Faks/E-mail : 0751 7057420
  - j. Alamat Rumah : Jl. Flaminggo No. 6 ATB, Padang
  - k. Telp/Faks/Email : 081363348628/ desy\_kimiaunp22@yahoo.com
4. Jumlah Anggota Peneliti : 1 (satu) orang  
Nama dan Gelar : Edi Nasra, S.Si, M.Si
5. Lokasi Penelitian : Laboratorium Jurusan Kimia FMIPA UNP  
Jumlah biaya penelitian : Rp. 7.500.000,-

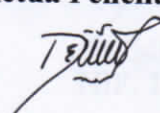
Terbilang : Tujuh juta lima ratus ribu rupiah

**Menyetujui  
Pembimbing Penelitian**


  
Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D  
NIP. 19721024 199803 1 001

**Padang, Desember 2011**

**Ketua Peneliti,**

  
Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si  
NIP. 19751122 200312 2 003

**Mengetahui/Menyetujui  
Dekan Fakultas MIPA UNP**

  
Prof. Dr. Lufri, M.S.  
NIP. 19610510 198703 1 020

**Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Negeri Padang**

  
Dr. Arwen Bentri, M.Pd  
NIP. 19610722 198602 1 002

## LEMBARAN IDENTITAS DAN PENGESAHAN PENELITIAN

1. a. Judul Penelitian : Penentuan kadar sakarin dan kafein pada beberapa minuman *soft drink* secara HPLC
- b. Bidang Ilmu : MIPA (Kimia)
2. Personalia
  - a. Ketua Peneliti
    - Nama Lengkap dan Gelar : Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si
    - Pangkat/Gol./NIP : Penata / III-c / 19751122 200312 2 003
    - Fakultas/Jurusan : FMIPA / Kimia
  - b. Anggota Peneliti
    - Nama Lengkap dan Gelar : Edi Nasra, S.Si, M.Si
    - Pangkat/Gol./NIP : Penata Muda / III-a / 19810622 200312 1 001
    - Fakultas/Jurusan : FMIPA / Kimia
3. Laporan Penelitian : Telah direvisi sesuai saran pembahas

**Mengetahui :**  
**Ketua Lembaga Penelitian**  
**Universitas Negeri Padang,**




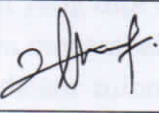
Dr. Alwen Bentr, M.Pd  
NIP. 19610722 198602 1 002

**Padang, Desember 2011**

**Pembahas,**

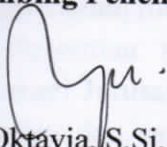
Dr. Mawardi, M.Si  
NIP. 19611123 198903 1 002

**HALAMAN BUKTI KETERLIBATAN MAHASISWA DALAM PROSES  
PENELITIAN**

No.	Nama Mahasiswa	NIM	Bentuk Keterlibatan	Tanda Tangan Mahasiswa
1.	Reviana Ervita	2034-08	Pengumpul sampel, pengolah data, penyelesaian skripsi	
2.	Aulya Rahmah	2060-08	Pengumpul sampel, pengolah data, penyelesaian skripsi	


**Padang, Desember 2011**

**Menyetujui  
Pembimbing Penelitian**



Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, Ph.D  
NIP. 19721024 199803 1 001

**Ketua Peneliti,**



Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si  
NIP. 19751122 200312 2 003



## RINGKASAN DAN SUMMARY

### PENENTUAN KADAR SAKARIN DAN KAFEIN PADA BEBERAPA MINUMAN *SOFT DRINK* SECARA HPLC

(Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si dan Edi Nasra, S.Si, M.Si)

Berbagai minuman ringan (*soft drink*) yang beredar di pasaran berupaya menarik konsumen dengan rasa yang enak, warna yang menarik dan energi yang diperoleh setelah meminum produk mereka. Untuk mencapai tujuan tersebut produsen menambahkan zat tambahan makanan untuk memenuhi proporsi kandungan tertentu dalam minuman tersebut dan juga untuk meningkatkan keawetannya. Beberapa zat tambahan makanan yang sering ditambahkan pada minuman ringan adalah kafein sebagai penambah energi dan sakarin sebagai penambah rasa/pemanis.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi terbaik penentuan kadar kafein dan sakarin dalam minuman ringan menggunakan fasa gerak etanol:air dan kolom ODS C18. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kadar kafein dan sakarin dalam minuman ringan yang dijual bebas di pasaran.

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Juli hingga November 2011 di Laboratorium Jurusan Kimia FMIPA UNP. Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan kadar kafein dan sakarin dalam beberapa minuman ringan (*softdrink*) yang beredar di pasaran. Pertamakali ditentukan panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  max) untuk kafein dan sakarin menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, dari pengukuran diperoleh  $\lambda$  max untuk kafein dan sakarin yaitu 273 nm dan 272 nm berturut-turut. Dalam penentuan kondisi optimum pengukuran kadar kafein dan sakarin tersebut ada variabel tetap dan variabel bebas. Variabel tetap adalah ; 1)  $\lambda$  max = 273 nm, 2) Kolom yang digunakan ODS C18, 3) fasa gerak etanol:air, sedangkan variabel bebasnya adalah konsentrasi fasa gerak.

Dari hasil penelitian diperoleh kondisi optimum pemisahan dan penentuan kadar kafein dan sakarin. Konsentrasi etanol:air (50:50) memberikan pemisahan yang terbaik dengan waktu retensi (RT) 3,3 menit untuk kafein dan 6 menit untuk sakarin. Kurva kalibrasi linier untuk larutan standar telah dibuat dan dilakukan analisa kadar kafein dan sakarin pada kondisi terbaik, yaitu laju alir eluen etanol:air (50:50) 1 ml/menit, kolom ODS C18 dan  $\lambda = 273$  nm. Aplikasi pada sampel minuman ringan terdapat kafein dan sakarin dalam berbagai konsentrasi, dengan konsentrasi tertinggi kafein 1210,0 ppm dan konsentrasi tertinggi sakarin 10023,1 ppm diantara minuman ringan tersebut.



## PENGANTAR

Kegiatan penelitian mendukung pengembangan ilmu serta terapannya. Dalam hal ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang berusaha mendorong dosen untuk melakukan penelitian sebagai bagian integral dari kegiatan mengajarnya, baik yang secara langsung dibiayai oleh dana Universitas Negeri Padang maupun dana dari sumber lain yang relevan atau bekerjasama dengan instansi terkait.

Sehubungan dengan itu, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang bekerjasama dengan Pimpinan Universitas, telah memfasilitasi peneliti untuk melaksanakan penelitian tentang *Penentuan Kadar Sakarin Dan Kafein Pada Beberapa Minuman Soft Drink Secara HPLC*, sesuai dengan surat perjanjian Penelitian DIPA Anggaran 2011 Nomor: 332/UN35.2/PG/2011 Tanggal 19 Juli 2011.

Kami menyambut gembira usaha yang dilakukan peneliti untuk menjawab berbagai permasalahan pembangunan, khususnya yang berkaitan dengan permasalahan penelitian tersebut di atas. Dengan selesainya penelitian ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang telah dapat memberikan informasi yang dapat dipakai sebagai bagian upaya penting dalam peningkatan mutu pendidikan pada umumnya. Di samping itu, hasil penelitian ini juga diharapkan memberikan masukan bagi instansi terkait dalam rangka penyusunan kebijakan pembangunan.

Hasil penelitian ini telah ditelaah oleh tim pembahas usul dan laporan penelitian, kemudian untuk tujuan diseminasi, hasil penelitian ini telah diseminarkan ditingkat Universitas. Mudah-mudahan penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pada umumnya dan khususnya peningkatan mutu staf akademik Universitas Negeri Padang.

Pada kesempatan ini, kami ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu pelaksanaan penelitian ini, terutama kepada pimpinan lembaga terkait yang menjadi objek penelitian, responden yang menjadi sampel penelitian, dan tim pereriu Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang. Secara khusus, kami menyampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Negeri Padang yang telah berkenan memberi bantuan pendanaan bagi penelitian ini. Kami yakin tanpa dedikasi dan kerjasama yang terjalin selama ini, penelitian ini tidak akan dapat diselesaikan sebagaimana yang diharapkan dan semoga kerjasama yang baik ini akan menjadi lebih baik lagi di masa yang akan datang.

Terima kasih.



Padang, Desember 2011  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Negeri Padang

Dr. Alwen Bentri, M.Pd  
NIP. 19610722 198602 1 002

## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN .....	i
LEMBARAN IDENTITAS DAN PENGESAHAN PENELITIAN .....	ii
HALAMAN BUKTI KETERLIBATAN MAHASISWA DALAM PROSES PENELITIAN .....	iii
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	iv
PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	x
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1. Sakarin .....	4
2.2. Kafein .....	7
2.3. Penentuan kadar sakarin dan kafein secara kromatografi .....	10
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	12
3.1. Tujuan Penelitian .....	12
3.2. Manfaat Penelitian .....	12
BAB IV METODE PENELITIAN .....	13
4.1. Jenis Penelitian .....	13
4.2. Objek Penelitian .....	13
4.3. Alat dan Bahan .....	13
4.4. Prosedur penelitian .....	13



4.5. Teknik Analisis Data.....	14
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>15</b>
5.1. Sampling minuman ( <i>soft drink</i> ).....	15
5.2. Penetapan panjang gelombang pengukuran .....	15
5.3. Penentuan kondisi optimum untuk penentuan sakarin dan kafein secara HPLC .....	17
5.4. Penentuan kadar sakarin dan kafein secara HPLC .....	20
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>24</b>
6.1. Kesimpulan.....	24
6.2. Saran.....	24
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>25</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>26</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Variasi konsentrasi kafein terhadap luas puncak.....	18
Tabel 2. Variasi konsentrasi sakarin terhadap luas puncak. ....	19
Tabel 3. Luas puncak kafein dari masing-masing sampel.....	21
Tabel 4. Luas puncak sakarin dari masing-masing sampel. ....	22
Tabel 5. Konsentrasi kafein dan sakarin dari masing-masing sampel.....	23



## 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. Roache J. D., dkk. (1987) menemukan bahwa kafein dalam konsentrasi tertentu dapat mempengaruhi kinerja psikomotor seseorang sedangkan menurut A. Smith (2002) selain mengakibatkan efek negatif, ternyata kafein juga dapat meningkatkan kewaspadaan, kinerja dan mengurangi kelelahan.

Kafein merupakan senyawa hasil metabolisme sekunder golongan alkaloid. Kafein bekerja di dalam tubuh dengan mengambil alih reseptor adenosin dalam sel saraf. Peranan utama kafein di dalam tubuh adalah meningkatkan kerja psikomotor sehingga tubuh tetap terjaga dan memberikan efek fisiologis berupa peningkatan energi. Dalam dunia medis, kafein yang banyak terkandung dalam minuman yang kita konsumsi hampir setiap hari ini dikenal sebagai trimethylxantine dengan rumus kimia  $C_8H_{10}N_4O_2$ .

Kafein dijumpai secara alami pada bahan pangan seperti biji kopi, daun teh, buah kola, guarana, dan *maté*. Pada tumbuhan, kafein berperan sebagai pestisida alami yang melumpuhkan dan mematikan serangga-serangga tertentu yang memakan tanaman tersebut. Kafein umumnya dikonsumsi oleh manusia dengan mengekstraksinya dari biji kopi dan daun teh.

Kafein merupakan obat perangsang sistem pusat saraf pada manusia dan dapat mengusir rasa kantuk secara sementara. Minuman yang mengandung kafein, seperti kopi,

teh, dan minuman ringan, sangat digemari. Kafein merupakan zat psikoaktif yang paling banyak dikonsumsi di dunia. Tidak seperti zat psikoaktif lainnya, kafeina legal dan tidak diatur oleh hukum di hampir seluruh yuridiksi dunia. Di Amerika Utara, 90% orang dewasa mengonsumsi kafein setiap hari.

Selain kafein, sakarin juga merupakan zat kimia yang banyak digunakan dalam industri makanan dan minuman. Sakarin adalah zat pemanis buatan dari garam natrium dari asam sakarin berbentuk bubuk kristal putih, tidak berbau dan sangat manis. Pemanis buatan ini mempunyai tingkat kemanisan 550 kali gula biasa. Oleh karena itu sangat populer dipakai sebagai bahan pengganti gula. Namun menurut Rogers P. J., dkk. (1989) penggunaan sakarin dalam makanan ternyata tidak meningkatkan rasa kenyang yang ditimbulkan dibandingkan pemakaian sukrosa dan glukosa.

Penggunaan sakarin dan kafein dalam industri makanan dan minuman ini saat ini sangat mungkin digunakan karena kemudahan dalam mendapatkan dan keunggulannya seperti sakarin dibandingkan pemanis biasa. Namun penggunaan yang berlebihan dalam kehidupan sehari-hari ataupun dosis yang tinggi dalam minuman dapat menyebabkan efek buruk pada manusia. Untuk itu perlu dilakukan penelitian, berapakah kadar sakarin dan kafein dalam minuman softdrink yang dijual secara bebas di Indonesia dengan menggunakan alat HPLC.

Penentuan kadar sakarin dan kafein menggunakan kromatografi merupakan teknik yang juga berkembang dalam kimia analitik. Beberapa penelitian menggunakan HPLC telah dilaporkan oleh J.W. Weyland, dkk (1982), Qing-Chuan Chen and Jin Wang (2001), C.M. Lino and A. Pena (2010). Penggunaan HPLC pada penentuan sakarin dan kafein ini sangat tepat karena analisis dengan HPLC cepat, daya pisah baik, peka, penyiapan sampel mudah, dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai (Joachim Weiss, 1995).



## 1.2. Perumusan Masalah

Yang menjadi masalah pada penelitian ini adalah berapakah kadar sakarin dan kafein pada minuman ringan yang dijual bebas. Penelitian ini terbatas pada hal-hal berikut ::

- a. Sampel diambil dari beberapa minuman soft drink yang dijual bebas
- b. Penentuan kadar sakarin dan kafein ditentukan secara HPLC

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Sakarin

Bahan pemanis buatan adalah bahan pemanis yang dihasilkan melalui reaksi-reaksi kimia organik di laboratorium atau dalam skala industri, boleh juga dikatakan diperoleh secara sintesis, dan tidak menghasilkan kalori seperti halnya bahan pengganti gula. Kebanyakan bahan pemanis itu campuran dari sakarin dan siklamat. Organisasi Pangan Dunia (WHO) telah menetapkan batas-batas yang disebut ADI werte (kebutuhan per orang tiap harinya), yaitu sejumlah yang dapat dikonsumsi tanpa menimbulkan resiko. Nilai ini untuk orang dewasa tidak terlalu banyak berarti, tetapi bagi anak-anak relatif menimbulkan kepekaan yang besar. Untuk sakarin batas tersebut adalah 5 mg per kg berat badan, adapun untuk siklamat 11 mg per kg berat badan, artinya jika 1 tablet mengandung 16,5 mg sakarin atau 70 mg siklamat, maka untuk seorang yang berberat badan 70 kg jumlah yang disarankan untuk dikonsumsi per hari tidak lebih dari 21 tablet sakarin atau 11 tablet siklamat.

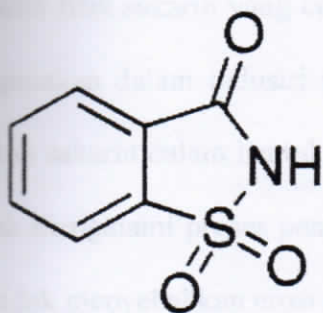
Telah diketahui, tubuh manusia atau hewan terdiri dari berbagai alat tubuh dan jaringan. Alat tubuh atau jaringan tersebut tersusun dari unit-unit yang sangat kecil, disebut sel. Sel-sel ini mempunyai fungsi yang berlainan, akan tetapi mereka memperbanyak jumlahnya dengan cara pembelahan yang sama. Dalam keadaan normal, proses pembelahan itu diatur sedemikian rupa sehingga jumlah sel baru yang dibentuk adalah sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan untuk menggantikan sel-sel yang sudah usung atau mati, agar bentuk alat tubuh atau jaringan tersebut tetap tersusun dalam proporsi yang seimbang dan serasi. Bilamana proses pembelahan sel itu menyimpang dan tidak dapat dikendalikan, akan menimbulkan pertumbuhan yang abnormal. Pertumbuhan abnormal ini disebut neoplasia atau tumbuh ganda. Penyebab dan atau faktor-faktor



penyelewengan proses pembelahan sel itu banyak macamnya, diantaranya yang sekarang sering diperbincangkan ialah yang disebabkan oleh bahan-bahan bersifat kimia dan mikotoksi.

### 2.1.1. Struktur Kimia Dan Rasa

Perubahan yang kecil dalam struktur kimia dapat merubah rasa dari senyawa tersebut, misalnya rasa manis menjadi pahit atau hambar. Contoh : efek substitusi dari sakarin (sakarin 500 kali lebih manis dari gula)



Gambar 1. Benzoic sulfimide atau sakarin (www.wikipedia.org)

Sakarin adalah pemanis buatan yang memiliki struktur dasar sulfonida benzoat. Karena strukturnya berbeda dengan karbohidrat, sakarin tidak menghasilkan kalori. Sakarin jauh lebih manis dibanding sukrosa, dengan perbandingan rasa manis kira-kira 400 kali lipat sukrosa. Namun sayangnya dalam konsentrasi sedang sampai tinggi bersifat meninggalkan *aftertaste* pahit atau rasa logam. Untuk menghilangkan rasa ini sakarin dapat dicampurkan dengan siklamat dalam perbandingan 1:10 untuk siklamat.

Sakarin diperkenalkan pertama kali oleh Fahlberg pada tahun 1879 secara tidak sengaja dari industri tar batubara. Penggunaannya secara komersial sudah diterapkan sejak tahun 1884. Namun sakarin baru terkenal oleh masyarakat luas setelah perang dunia I, di mana sakarin berperan sebagai pemanis alternatif pengganti gula pasir yang sulit diperoleh. Sakarin menjadi lebih populer lagi di pasaran pada tahun 1960-an dan 1970-an. Saat itu,

sifatnya sebagai pemanis tanpa kalori dan harga murah menjadi faktor penarik utama dalam penggunaan sakarin. Selain itu sakarin tidak bereaksi dengan bahan makanan, sehingga makanan yang ditambahkan sakarin tidak mengalami kerusakan. Sifat yang penting untuk industri minuman kaleng atau kemasan. Karena itulah, sakarin dalam hal ini sering digunakan bersama dengan aspartame agar rasa manis dalam minuman tetap bertahan lama. Seperti yang sudah dibahas sebelumnya, aspartame tidak bertahan lama dalam minuman kemasan.

Sifat fisik sakarin yang cukup dikenal adalah tidak stabil pada pemanasan. Sakarin yang digunakan dalam industri makanan adalah sakarin sebagai garam natrium. Hal ini disebabkan sakarin dalam bentuk aslinya yaitu asam, bersifat tidak larut dalam air. Sakarin juga tidak mengalami proses penguraian gula dan pati yang menghasilkan asam; sehingga sakarin tidak menyebabkan erosi enamel gigi.

Sakarin merupakan pemanis alternatif untuk penderita diabetes melitus, karena sakarin tidak diserap lewat sistem pencernaan. Meskipun demikian, sakarin dapat mendorong sekresi insulin karena rasa manisnya; sehingga gula darah akan turun.

### **2.1.2. Penggunaan**

Sakarin sempat digunakan secara luas sebagai pemanis dalam produk makanan kemasan (minuman atau buah kalengan, permen karet, selai, dan permen), bahan suplemen (vitamin dan sejenisnya), obat-obatan, dan pasta gigi. Selain itu sakarin juga digunakan sebagai gula di restoran, industri roti, dan bahan kosmetik.



### 2.1.3. Keamanan

Sakarin mulai diteliti sejak lebih dari 100 tahun yang lalu. Ahli yang pertama kali menentang penggunaan sakarin, karena dianggap merugikan kesehatan adalah Harvey Wiley. Menurut Harvey Wiley, sakarin memang manis seperti gula pasir biasa namun karena struktur kimianya yang menyerupai tar batubara tetap saja yang dikonsumsi adalah tar batubara yang seharusnya tidak dimakan. Namun pernyataan terus dibantah keras oleh presiden Amerika Serikat saat itu, Theodore Roosevelt. Memang sejak pertama diperkenalkan secara luas kepada masyarakat sampai saat itu, belum ada efek buruk sebagai akibat konsumsi sakarin.

Sejak saat itu, keamanan penggunaan sakarin terus diperdebatkan sampai sekarang. Adapun bahaya yang ditimbulkan sakarin adalah efek karsinogenik. Pada sebuah penelitian di tahun 1977, mencit percobaan mengalami kanker empedu setelah mengkonsumsi sakarin dalam jumlah besar. Penentuan efek serupa pada manusia lebih sulit, karena sebagian besar produk makanan yang ada saat ini menggunakan beberapa pemanis buatan sekaligus. Penelitian oleh Weihrauch & Diehl (2004) menunjukkan bahwa konsumsi kombinasi pemanis buatan dalam jumlah besar (>1.6 gram/hari) meningkatkan risiko kanker empedu sebanyak hanya 1.3 kali lipat pada manusia. Namun pemanis manakah yang menimbulkan efek ini tidak diketahui. Setelah beberapa tahun meneliti, sebagian besar ahli akhirnya menyimpulkan bahwa sakarin tidak bersifat karsinogenik pada manusia.

### 2.2. Kafein

Manusia telah mengkonsumsi kafein sejak Zaman Batu. Manusia zaman dahulu menemukan bahwa penguyahan biji, ranting, dan daun tumbuh-tumbuhan tertentu memiliki efek meringankan rasa lelah, merangsang kesadaran, dan memperbaiki suasana

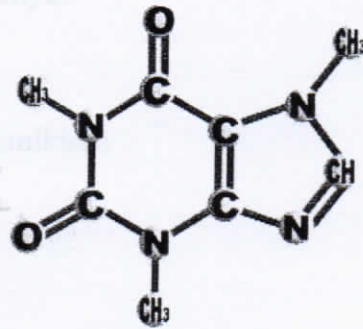
hati. Efek kafein ini kemudian ditemukan dapat ditingkatkan dengan menyeduhkan bagian tumbuhan tersebut dengan air panas. Banyak kebudayaan yang mempunyai legenda mengenai asal usul tumbuhan tersebut.

Menurut salah satu legenda populer Cina, Kaisar Cina Shénnóng, yang dimitoskan telah berkuasa sekitar tahun 3000 SM, tanpa sengaja menemukan bahwa ketika beberapa dedaunan jatuh ke dalam air mendidih, minuman yang wangi dan dapat memulihkan tenaga dihasilkan. Shennong juga disebut-sebut dalam karya Lu Yu, *Cha Jing*, mengenai teh. Sejarah kopi pun telah tercatat sejak abad ke-9. Pada saat itu, biji kopi hanya tersedia dari habitat aslinya saja, Etiopia. Legenda populer menceritakan penemuan kopi oleh seorang penggembala kambing bernama Kaldi yang memantau bahwa kambing-kambingnya menjadi lebih aktif dan tidak tidur pada malam hari setelah merumputi semak-semak kopi. Setelah ia mencoba buah kopi yang dimakan oleh kambingnya, ia juga mendapatkan khasiat yang sama. Literatur paling awal yang menyebutkan adanya kopi kemungkinan adalah sebuah referensi mengenai Bunchum dalam karya seorang Persia al-Razi. Pada tahun 1587, Malaye Jaziri menyusun suatu karya yang menilik sejarah dan kontroversi hukum kopi berjudul "Undat al safwa fi hill al-qahwa". Dalam karyanya ini, Jaziri mencatat bahwa seorang Sheikh, Jamal-al-Din al-Dhabhani, mufti Aden, adalah yang pertama menggunakan kopi pada tahun 1454, dan pada abad ke-15, para Sufi Yaman secara rutin menggunakan kopi untuk terus terbangun selama berdoa.

Kafein merupakan senyawa hasil metabolisme sekunder golongan alkaloid. Kafein bekerja di dalam tubuh dengan mengambil alih reseptor adenosin dalam sel saraf. Peranan utama kafein di dalam tubuh adalah meningkatkan kerja psikomotor sehingga tubuh tetap terjaga dan memberikan efek fisiologis berupa peningkatan energi. Dalam dunia medis,



kafein yang banyak terkandung dalam minuman yang kita konsumsi hampir setiap hari ini dikenal sebagai trimethylxantine dengan rumus kimia  $C_8H_{10}N_4O_2$ .



Gambar 2. Trimethylxantine atau kafein ([www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org))

### 2.2.1. Makanan & minuman yang mengandung kafein

*Kopi*, terkenal akan kandungan kafeinnya yang tinggi. Kafein kopi merupakan senyawa hasil metabolisme sekunder golongan alkaloid dari tanaman kopi dan memiliki rasa yang pahit.

*Teh*, merupakan sumber alami kafein, teofilin dan antioksidan dengan kadar lemak, karbohidrat atau protein mendekati nol persen. Teh bila diminum terasa sedikit pahit.

*Cola*, adalah minuman yang berisi pewarna karamel, kafein dan pemanis seperti gula atau sirup jagung ber-fruktosa tinggi.

*Coklat*, berasal dari biji kakao mengandung sejumlah kecil kafein. Pengaruh stimulan lemah coklat mungkin karena kombinasi dari teobromin dan teofilin serta kafein.

*Minuman suplemen*, yang disebut-sebut menambah stamina, energi, dan keperkasaan saat ini sudah diakrabi masyarakat karena efeknya yang membuat badan menjadi bugar.

*Obat-obatan yang mengandung kafein*, sebagian besar obat flu yang kerap mengandung kafein dalam bahannya dengan tujuan menyeimbangkan dorongan rasa kantuk akibat bahan-bahan lainnya.



### 2.2.2. Dampak positif mengkonsumsi kafein

Mengkonsumsi kafein mempunyai efek jangka pendek yang positif bagi tubuh kita.

Berikut adalah efek-efek positifnya:

- Merasa tenang
- Meningkatkan pemahaman/pemikiran
- Meningkatkan daya ingat
- Meningkatkan reflek

### 2.2.3. Dampak negatif mengkonsumsi kafein

Selain mempunyai efek yang positif, mengkonsumsi kafein (*terutama kafein pada kopi*) juga mempunyai efek negatif bagi tubuh. Berikut adalah efek-efek negatifnya:

- Jantung berdebar
- Insomnia/susah tidur
- Buang air kecil berlebihan
- Diare

Potensi ketergantungan membuat kopi disamakan dengan zat-zat adiktif lainnya. Seorang peminum kopi yang menghentikan kebiasaan minum kopinya dapat mengalami "caffeine withdrawal" yang ditandai oleh sakit kepala berdenyut, namun gejala ini akan hilang setelah 24-48 jam.

### 2.3. Penentuan kadar sakarin dan kafein secara kromatografi

Kromatografi adalah salah satu teknik dalam kimia analitik yang berkembang dengan sangat cepat dan modern. Metoda ini dapat digunakan secara luas dalam identifikasi dan penentuan konsentrasi senyawa-senyawa organik maupun anorganik.

Penentuan kadar sakarin dan kafein menggunakan kromatografi merupakan salah satu cara yang cepat dan akurat dalam penentuan zat-zat aditif dalam makanan dan minuman. J.W. Weyland, dkk (1982), memisahkan sakarin, kafein dan asam benzoat dengan HPLC menggunakan program non-linear, Qing-Chuan Chen, dkk (2001) menentukan beberapa zat pemanis buatan secara simultan dengan ion kromatografi, Hayun, dkk (2004), menentukan kandungan sakarin dan beberapa zat aditif lainnya dalam minuman ringan bersoda menggunakan HPLC dengan fasa gerak asetronitril pada pH 4, C.M. Lino, dkk menentukan kadar kafein dan beberapa zat aditif dalam soft drink secara HPLC dengan fasa gerak  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.02 M/ACN (90:10)/asam fosfat pada pH 4.2.

Dari semua penelitian di atas telah dapat menentukan kadar sakarin dan kafein dengan baik, sekarang ini dicoba menggunakan fasa gerak dari metanol dan air untuk lebih menekan biaya analisa, terutama bila digunakan untuk analisa rutin.

## BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah (1) mencari kondisi optimum penentuan kadar sakarin dan kafein secara HPLC; (2) menentukan kadar sakarin dan kafein pada beberapa minuman soft drink yang dijual bebas.

### 3.2. Manfaat Penelitian

Kontribusi penelitian ini termasuk kategori penelitian I yaitu penelitian yang memberikan kontribusi pada perkembangan IPTEK dalam bidang kimia khususnya kimia analitik yaitu memberikan cara analisa yang mudah untuk penentuan sakarin dan kafein serta melihat apakah minuman tersebut telah sesuai dengan standar yang diperbolehkan untuk dikonsumsi.



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang akan dilakukan di Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia FMIPA UNP selama 6 (enam) bulan.

### 4.2. Objek Penelitian

Objek penelitian adalah minuman ringan yang dijual bebas di pasaran.

### 4.3. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah HPLC, Spektrofotometer UV-Vis, peralatan gelas, oven, kertas saring, neraca analitik, botol reagen, labu ukur, erlenmeyer, botol semprot, batang pengaduk, pipet tetes. Bahan yang digunakan adalah kafein standar, sakarin standar, etanol, aquadest.

### 4.4. Prosedur penelitian

Langkah-langkah utama penelitian adalah sebagai berikut: (a) Sampling minuman; (b) Penetapan panjang gelombang pengukuran ; (c) Mencari kondisi optimum untuk analisis sakarin dan kafein; (d) Penentuan kadar sakarin dan kafein secara HPLC.

#### a. Sampling minuman

Proses sampling minuman ringan dilakukan berdasarkan merk yang beredar dipasaran (supermarket di daerah kota Padang). 10 merek minuman ringan akan dipilih untuk digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini, diantaranya, minuman bersoda, teh botol dan minuman suplemen. Pemilihan sampel berdasarkan atas informasi kandungan bahan-bahan yang ditambahkan ke dalam sampel tersebut.

#### b. Penetapan panjang gelombang pengukuran

- 1) Pembuatan larutan baku 50 ppm

Dibuat larutan standar dari masing-masing bahan baku pembanding dengan kadar 50 ppm untuk sakarin dan kafein menggunakan pelarut aquadest yang sudah disaring.

2) Penetapan panjang gelombang pengukuran

Masing-masing larutan bahan baku pembanding tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 240-450 nm menggunakan spektrofotometer, lalu dibuat kurva serapannya. Kemudian ditentukan panjang gelombang untuk analisis.

c. **Penentuan kondisi optimum untuk penentuan sakarin dan kafein secara HPLC**

Larutan campuran bahan baku pembanding sakarin dan kafein di dalam pelarut aquades, disuntikan sebanyak 20  $\mu$ l ke dalam kolom menggunakan fase gerak campuran etanol dan air. Dipilih komposisi fasa gerak yang memberikan pemisahan terbaik berdasarkan waktu retensi ( $t_R$ ).

d. **Penentuan kadar sakarin dan kafein secara HPLC**

Kondisi terpilih kemudian digunakan pada analisis sampel.

#### 4.5. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif ditentukan berdasarkan waktu retensinya sedangkan data kuantitatif diperoleh dengan melihat luas daerah dari sakarin dan kafein pada kromatogram HPLC, kemudian ditentukan kadarnya dengan menggunakan kurva linear dari larutan standar.

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Sampling minuman (*soft drink*)

Telah dilakukan sampling terhadap 10 jenis merk minuman ringan yang dijual secara bebas dan telah dikonsumsi oleh masyarakat. Minuman tersebut dapat dibagi atas 3 kelompok, yaitu minuman berkarbonasi, minuman suplemen dan minuman teh dalam kemasan. Untuk kerahasiaan data, maka merk minuman tersebut telah disamarkan dan diganti dengan kode secara alphabet, yaitu A, B, C, D, E, F, G, H, I, dan J.

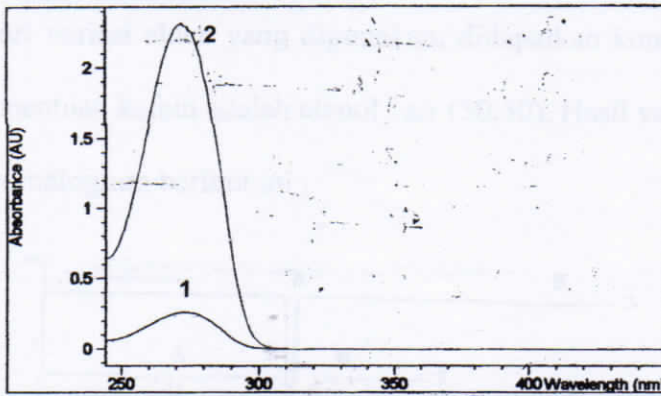
Dalam penentuan kafein dan sakarin, analisa kualitatif dilakukan berdasarkan waktu retensi dan analisa kuantitatif berdasarkan luas puncak. Untuk kemudahan dalam analisa, beberapa sampel minuman telah diencerkan hingga 10 kali.

### 5.2. Penetapan panjang gelombang pengukuran

Panjang gelombang pengukuran untuk pengukuran kadar sakarin dan kafein dilakukan terlebih dahulu menggunakan alat Spektrofotometri UV-Vis. Hasil yang didapatkan adalah panjang gelombang maksimum ( $\lambda$  max) untuk kafein adalah 273 nm dan untuk sakarin adalah 272 nm. Pada pengukuran dengan HPLC digunakan panjang gelombang 273 nm untuk kedua sampel tersebut.



Overlaid Sample Spectra

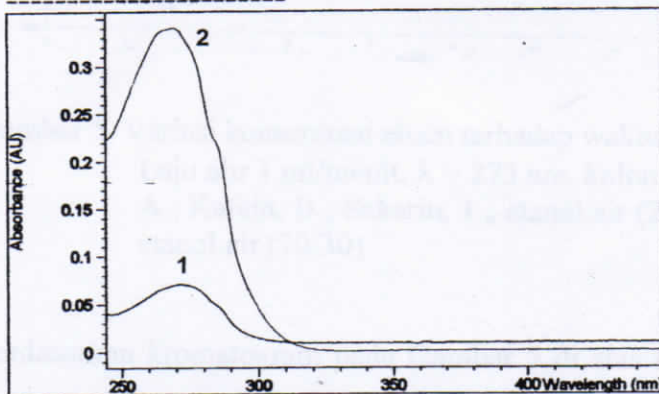


Sample/Result Table

#	Name	Abs<273nm>	#	Name	Abs<273nm>
1	5 ppm kafein	0.26162	2	50 ppm kafein	2.29600

Gambar 3. Spektrum UV-Vis Kafein

Overlaid Sample Spectra



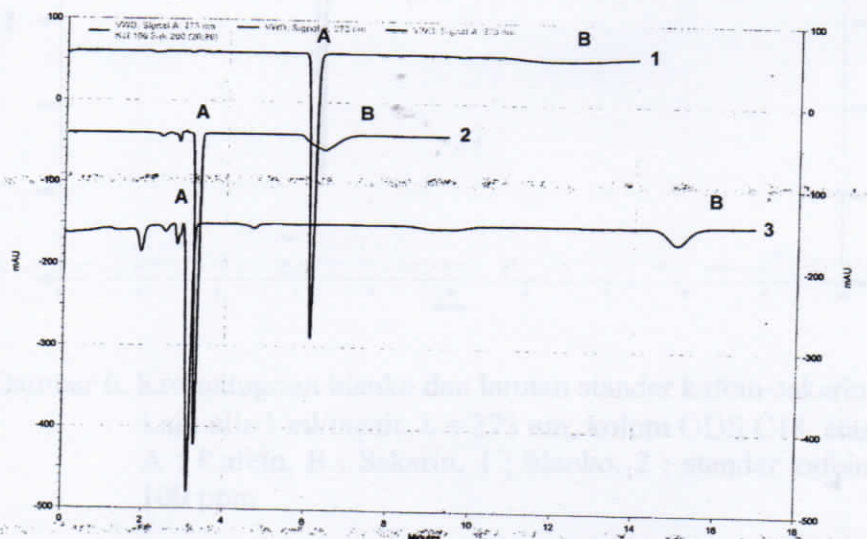
Sample/Result Table

#	Name	Abs<272nm>	#	Name	Abs<272nm>
1	5 ppm sakarin	7.0928E-2	2	50 ppm sakarin	0.33520

Gambar 4. Spektrum UV-Vis Sakarin

### 5.3. Penentuan kondisi optimum untuk penentuan sakarin dan kafein secara HPLC

- a. Dari variasi eluen yang digunakan, didapatkan kondisi optimum fasa gerak untuk penentuan kafein adalah etanol : air (50:50). Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada kromatogram berikut ini ;

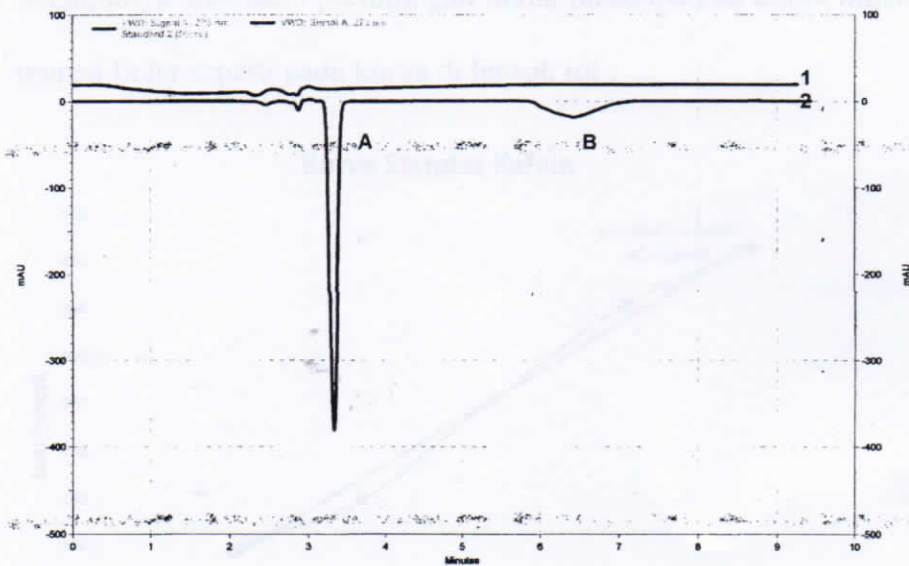


Gambar 5. Variasi konsentrasi eluen terhadap waktu retensi.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, Eluen etanol:air A ; Kafein, B ; Sakarin, 1 ; etanol:air (20:80), 2 ; etanol:air (50:50), 3 ; etanol:air (70:30)

Berdasarkan kromatogram pada Gambar 5 di atas terlihat bahwa pemisahan yang terbaik antara kafein dan sakarin diperoleh pada variasi konsentrasi eluen etanol : air adalah 50 : 50. Kafein memberikan waktu retensi pada 3,3 menit, sedangkan sakarin memberikan waktu retensi 6 menit.

Selanjutnya dilakukan uji terhadap larutan blanko pada konsentrasi eluen yang terbaik di atas etanol:air (50:50) untuk memastikan tidak ada puncak ataupun noise yang mengganggu analisa sampel. Kromatogram antara blanko dan sampel dapat dilihat pada Gambar 6 berikut ini.



Gambar 6. Kromatogram blanko dan larutan standar kafein-sakarin.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, etanol:air (50:50),  
 A ; Kafein, B ; Sakarin, 1 ; blanko, 2 ; standar kafein 50 ppm sakarin  
 100 ppm

b. Larutan Standar Kafein

Berdasarkan kondisi optimum yang diperoleh untuk variasi eluen dilakukan pengukuran larutan standar kafein pada konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm seperti pada tabel berikut ini.

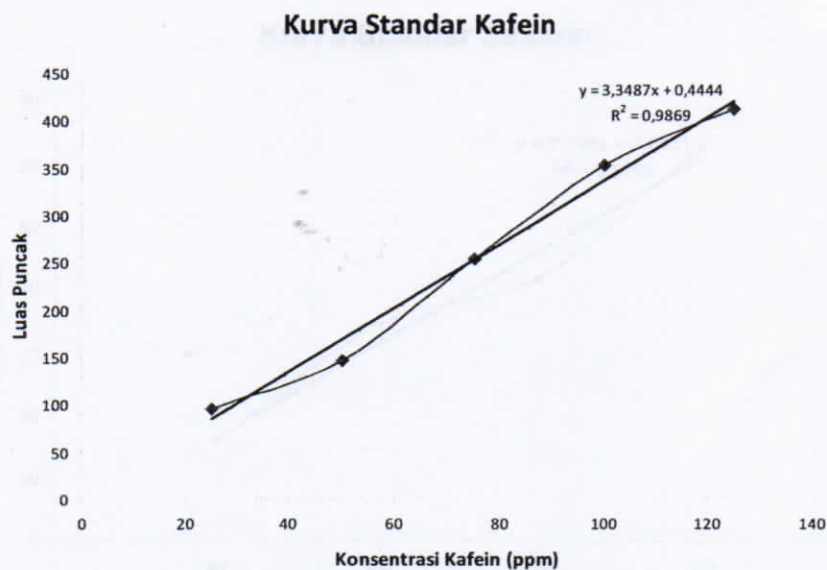
Tabel 1. Variasi konsentrasi kafein terhadap luas puncak.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

No	Konsentrasi (ppm)	Tinggi Puncak (mAU)	Lebar Puncak (menit)	Luas Puncak (mAU×mnt)
1.	25	305,6	0,313	95,6528
2.	50	436,3	0,335	146,1605
3.	75	766,8	0,330	253,044
4.	100	979,4	0,359	351,6046
5.	125	1192,8	0,345	411,516



Selanjutnya dilakukan perhitungan untuk mendapatkan kurva linier dan persamaan regresi linier seperti pada kurva di bawah ini :



Gambar 7. Kurva standar kafein.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

c. Larutan Standar Sakarin

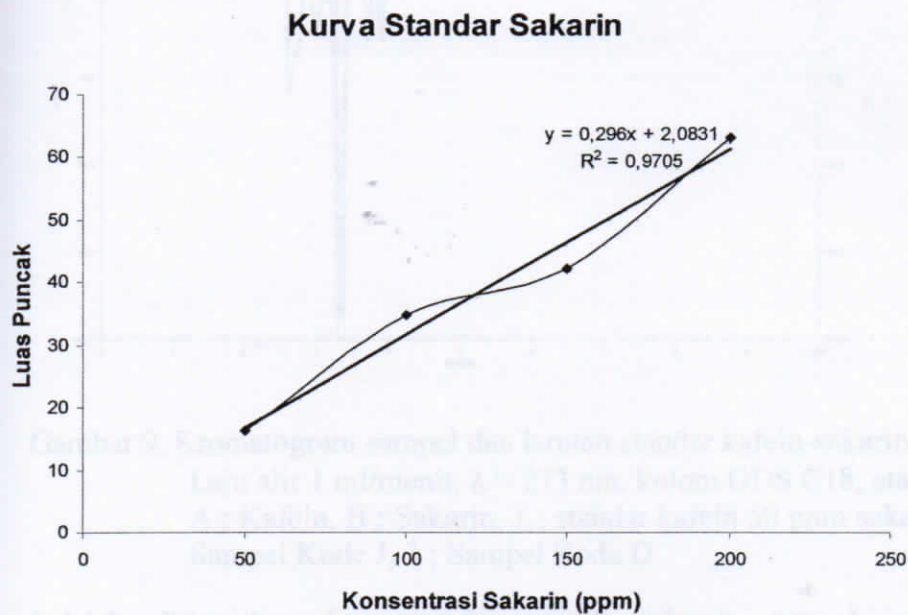
Berdasarkan kondisi optimum yang diperoleh untuk variasi eluen dilakukan pengukuran larutan standar sakarin pada konsentrasi 50, 100, 150 dan 200 ppm seperti pada tabel berikut ini.

Tabel 2. Variasi konsentrasi sakarin terhadap luas puncak.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

No	Konsentrasi (ppm)	Tinggi Puncak (mAU)	Lebar Puncak (menit)	Luas Puncak (mAU×mnt)
1.	50	17,3	0,939	16,2447
2.	100	18,9	1,843	34,8327
3.	150	27,5	1,53	42,075
4.	200	27,7	2,28	63,156

Selanjutnya dilakukan perhitungan untuk mendapatkan kurva linier dan persamaan regresi linier seperti pada kurva di bawah ini :



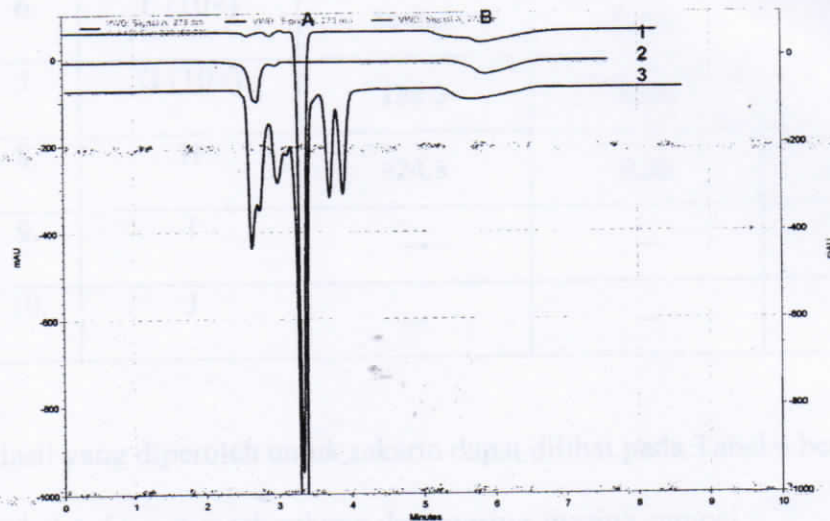
Gambar 8. Kurva standar sakarin.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

#### 5.4. Penentuan kadar sakarin dan kafein secara HPLC

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

Pada Gambar 9 berikut ini adalah dua kromatogram dari sampel dan larutan standar yang telah dianalisa dengan menggunakan HPLC. Dapat dilihat pada gambar, nomor 1 adalah larutan standar kafein-sakarin, nomor 2 adalah sampel dengan kode J dimana puncak dari kafein tidak ada yang berarti bahwa sampel minuman tersebut tidak mengandung kafein, sedangkan puncak dari sakarin ada yang menunjukkan bahwa minuman tersebut mengandung sakarin. Nomor 3 adalah sampel dengan kode D, dapat dilihat bahwa minuman mengandung kafein dan sakarin.



Gambar 9. Kromatogram sampel dan larutan standar kafein-sakarini.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273 \text{ nm}$ , kolom ODS C18, etanol:air (50:50),  
 A ; Kafein, B ; Sakarini, 1 ; standar kafein 50 ppm sakarini 100 ppm, 2 ;  
 Sampel Kode J, 3 ; Sampel Kode D

Setelah didapatkan kromatogram untuk seluruh sampel, maka dilakukan penghitungan luas puncak dari masing-masing komponen yaitu untuk kafein dan sakarini. Beberapa sampel diencerkan karena konsentrasi kafein atau sakarini terlalu tinggi sehingga menyulitkan dalam analisa luas puncak. Hasil yang diperoleh untuk kafein dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini :

Tabel 3. Luas puncak kafein dari masing-masing sampel.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273 \text{ nm}$ , kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

No	Sampel (pengenceran)	Tinggi Puncak (mAU)	Lebar Puncak (menit)	Luas Puncak (mAU×mnt)
1.	A	3258,03	0,366	1192,43898
2.	B	33,9	0,25	8,475
3.	C (5×)	---	---	---
4.	D	1877,1	0,38	713,298
5.	E	431,5	0,312	134,628



6.	F (10×)	1548,2	0,262	405,6284
7.	G (10×)	139,5	0,28	39,06
8.	H	924,3	0,25	231,075
9.	I	---	---	---
10.	J	---	---	---

Hasil yang diperoleh untuk sakarin dapat dilihat pada Tabel 4 berikut ini :

Tabel 4. Luas puncak sakarin dari masing-masing sampel.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273$  nm, kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

No	Sampel (pengenceran)	Tinggi Puncak (mAU)	Lebar Puncak (menit)	Luas Puncak (mAU×mnt)
1.	A	24,15	1,347	32,53
2.	B	---	---	---
3.	C (5×)	330,44	1,802	595,45
4.	D	22,53	1,27	28,61
5.	E	43,2	1,77	76,46
6.	F (10×)	12,3	1,29	15,87
7.	G (10×)	139,5	0,28	39,06
8.	H	8,95	0,29	2,60
9.	I	25,42	1,32	33,55
10.	J	30,7	1,32	40,52

Berdasarkan kurva regresi linear yang diperoleh untuk kedua sampel, maka kadar kafein dan sakarin dapat dihitung seperti dalam Tabel 5 berikut ini. Untuk sampel yang diencerkan, maka perhitungan kadar telah dikalikan dengan faktor pengenceran.

Tabel 5. Konsentrasi kafein dan sakarin dari masing-masing sampel.

Laju alir 1 ml/menit,  $\lambda = 273 \text{ nm}$ , kolom ODS C18, Eluen etanol:air (50:50)

No	Sampel	Konsentrasi Kafein (ppm)	Konsentrasi Sakarin (ppm)
1.	A	356,0	102,9
2.	B	2,4	---
3.	C	---	10023,1
4.	D	212,9	89,6
5.	E	40,1	251,3
6.	F	1210,0	465,7
7.	G	115,3	1249,2
8.	H	68,9	1,7
9.	I	---	531,6
10.	J	---	649,3

Dari Tabel 5 di atas dapat dilihat bahwa 10 sampel minuman ringan yang beredar di Kota Padang mengandung kafein dan sakarin dalam berbagai konsentrasi. Minuman dengan Kode F mempunyai konsentrasi kafein tertinggi yaitu 1210,0 ppm dan minuman dengan Kode C mempunyai konsentrasi sakarin tertinggi yaitu 10023,1 ppm.

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat disimpulkan :

1. Kafein dan sakarin menyerap pada panjang gelombang maksimum 273 nm dan 272 nm berturut-turut. Analisa dengan menggunakan HPLC dilakukan pada panjang gelombang 273 nm, laju alir 1 ml/menit, fasa gerak etanol:air (50:50), kolom ODS C18.
2. Pada minuman ringan terdapat kafein dan sakarin dengan berbagai konsentrasi, dengan konsentrasi tertinggi kafein 1210,0 ppm pada minuman ringan dengan kode F dan konsentrasi tertinggi sakarin 10023,1 ppm pada minuman ringan dengan kode C.
3. Kandungan kafein pada minuman ringan kode F tersebut masih memenuhi batas dosis penggunaan yang diizinkan yaitu 100-200 mg jika tidak meminumnya lebih dari 200 ml/hari.
4. Kandungan sakarin pada sampel dengan kode C telah melebihi dosis yang diizinkan, yaitu 5 mg/kg berat badan jika dianggap minuman tersebut diminum 100 ml/hari.

### 6.2. Saran

1. Dapat dilakukan penentuan kafein dari makanan ringan yang beredar di pasaran.
2. Puncak sakarin pada kromatogram belum dalam bentuk yang ideal, dapat dilakukan penentuan kadar sakarin dengan menggunakan eluen yang lain.



## DAFTAR PUSTAKA

- Chen Q.C., Wang J., (2001), Simultaneous determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography, *Journal of Chromatography A*, Volume 937, Issues 1-2, 57-64.
- Hayun, Yahdiana H., Citra N.A., (2004), Penetapan kadar sakarin, asam benzoate, asam sorbet, kofeina dan aspartame di dalam beberapa minuman ringan bersoda secara kromatografi cair kinerja tinggi., *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol 1, No 3, 148-159.
- Lino C.M., Pena A., (2010), Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment, *Food Chemistry*, Volume 121, Issue 2, 503-508.
- Roache J. D., Griffiths R. R., (1987), Interactions of diazepam and caffeine: Behavioral and subjective dose effects in humans, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Volume 26, Issue 4, 801-812
- Rogers P. J., Blundell J. E., (1989), Separating the actions of sweetness and calories: Effects of saccharin and carbohydrates on hunger and food intake in human subjects, *Physiology & Behavior*, Volume 45, Issue 6, 1093-1099
- Smith A., (2002), Effects of caffeine on human behavior, *Food and Chemical Toxicology*, Volume 40, Issue 9, 1243-1255
- Weyland J.W., Rolink H., Doornbos D.A., (1982), Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of saccharin, caffeine and benzoic acid using non-linear programming, *Journal of Chromatography A*, Volume 247, Issue 2, 221-229.
- Weiss, Joachim, (1995), *Ion Chromatography*, 2 ed., Weinheim, VCH.
- [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)