

DANA JURUSAN

LAPORAN PENELITIAN



**PENENTUAN KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM
BENZOAT PADA BEBERAPA MINUMAN *SOFT DRINK*
SECARA HPLC**

Oleh:

**Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si
Drs. H. Zul Afkar.M.S
Edi Nasra, S.Si, M.Si**

Penelitian ini dibiayai oleh :
Dana Jurusan Tahun Anggaran 2012
Sesuai dengan Surat Keputusan Dekan
Nomor: 224/UN35.1.1/KP/2012
Tanggal 17 September 2012

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2012**

tdk

DANA JURUSAN

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS NEGERI PADANG
TELAH TERDAFTAR

LAPORAN PENELITIAN

JUDUL : PENENTUAN KADAR ASAM
ASKORBAT DAN ASAM

PENGARANG : DESY KURNIAWATI, DKK

JENIS : LAPORAN PENELITIAN

NOMOR : 91/UN.35.12/PK./KI/2013

TANGGAL : 22 APRIL 2013



**PENENTUAN KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM
BENZOAT PADA BEBERAPA MINUMAN *SOFT DRINK*
SECARA HPLC**

Oleh:

Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si
Drs. H. Zul Afkar.M.S
Edi Nasra, S.Si, M.Si

Penelitian ini dibiayai oleh :
Dana Jurusan Tahun Anggaran 2012
Sesuai dengan Surat Keputusan Dekan
Nomor: 224/UN35.1.1/KP/2012
Tanggal 17 September 2012

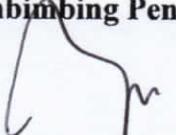
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2012

HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN

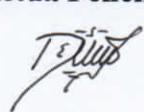
1. Judul Penelitian : **Penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada beberapa minuman *soft drink* secara HPLC**
4. Bidang Penelitian : MIPA yaitu Kimia
5. Ketua Peneliti
- d. Nama Lengkap : **Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si**
- e. Jenis Kelamin : Perempuan
- f. NIP : 19751122 200312 2 003
- g. Disiplin Ilmu : Kimia Analitik
- h. Pangkat/Golongan : III-c / Penata
- i. Jabatan : Lektor
- j. Fakultas/Jurusan : Kimia / FMIPA
- k. Alamat : Jl. Hamka, Kampus UNP Air Tawar Padang
- l. Telp/Faks/E-mail : 0751 7057420
- m. Alamat Rumah : Jl. Flaminggo No. 6 ATB, Padang
- n. Telp/Faks/Email : 081363348628/ desy_kimiaunp22@yahoo.com
6. Jumlah Anggota Peneliti : 2 (dua) orang
Nama dan Gelar : Drs. Zul Afkar, M.S dan Edi Nasra, S.Si, M.Si
5. Lokasi Penelitian : Laboratorium Penelitian Jurusan Kimia FMIPA
- Jumlah biaya penelitian : Rp. 2.500.000,-

Terbilang : Dua juta lima ratus ribu rupiah

**Menyetujui
Pembimbing Penelitian**


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

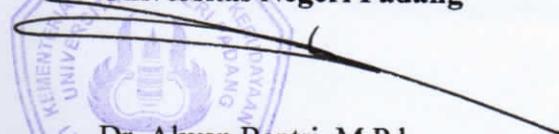
**Padang, 29 Desember 2012
Ketua Peneliti,**


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

**Mengetahui/Menyetujui
Dekan Fakultas MIPA UNP**


Prof. Dr. Lufri, MS
NIP. 19610510 198703 1 020

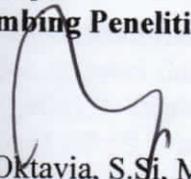
**Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Negeri Padang**


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

**HALAMAN BUKTI KETERLIBATAN MAHASISWA DALAM PROSES
PENELITIAN**

No.	Nama Mahasiswa	NIM	Bentuk Keterlibatan	Tanda Tangan Mahasiswa
1.	Nailul Rahmi	02068-08	Pengumpul sampel, pengolah data	
2.	Rani Sanjaya	02066-08	Pengumpul sampel, pengolah data	

**Menyetujui
Pembimbing Penelitian**


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

**Padang, 29 Desember 2012
Ketua Peneliti,**


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

RINGKASAN DAN SUMMARY

PENENTUAN KADAR ASAM ASKORBAT DAN ASAM BENZOAT PADA BEBERAPA MINUMAN *SOFT DRINK* SECARA HPLC

(Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si , Drs.H. Zul Afkar,M.S 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 asam askorbat dan asam benzoat.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi terbaik penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat secara HPLC dalam minuman ringan menggunakan pelarut metanol. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kadar asam askorbat dan asam benzoat dalam minuman ringan yang dijual bebas di pasaran.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kondisi optimum HPLC yang menggunakan fasa gerak metanol dan buffer asetat berada pada laju alir 1 ml/mnt, Kolom ODS C₁₈, $\lambda=240$ nm, pH 3.5, dilakukan secara elusi gradien yang dimulai pada komposisi fasa gerak 5:95 hingga 50:50 selama 5 menit dengan waktu retensi untuk asam askorbat adalah 3.73 menit dan 11.07 menit untuk asam benzoat. Dari hasil uji kadar sampel minuman ringan yang dijual di lingkungan sekolah tidak ditemukan asam askorbat dan asam benzoat sebagai bahan pengawet, sedangkan untuk minuman ringan yang beredar di pasaran dari 5 sampel yang diuji ditemukan sampel yang mengandung asam benzoat yang melebihi batas maksimum yang diizinkan yang terdapat pada sampel C yaitu 676 ppm, sedangkan kadar yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk asam benzoat adalah 600 ppm, sedangkan untuk kandungan asam askorbat terbanyak terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm.

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 Asam Askorbat Dan Asam Benzoat Pada Beberapa Minuman Soft Drink Secara HPLC*, sesuai dengan surat Keputusan Dekan Anggaran 2012 Nomor: 224/UN35.1.1/KP/2012 Tanggal 17 September 2012.

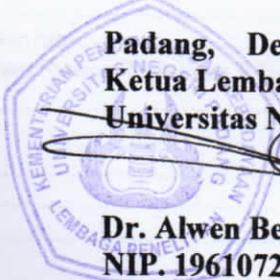
Kami menyambut gembira usaha yang dilakukan peneliti untuk menjawab berbagai permasalahan pembangunan, khususnya yang berkaitan dengan permasalahan penelitian tersebut di atas. Dengan selesainya penelitian ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang telah dapat memberikan informasi yang dapat dipakai 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 pereviu 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 2012
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Negeri Padang


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

DAFTAR ISI

LEMBARAN IDENTITAS DAN PENGESAHAN PENELITIAN.....	i
HALAMAN PENGESAHAN PENELITIAN	ii
HALAMAN BUKTI KETERLIBATAN MAHASISWA DALAM PROSES PENELITIAN	iii
RINGKASAN DAN SUMMARY	iv
PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Asam Askorbat (Vitamin C).....	4
2.2. Asam Benzoat	6
2.3. Metoda Analisis Kromatografi.....	7
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
3.1. Tujuan Penelitian.....	10
3.2. Manfaat Penelitian.....	10
BAB IV. METODE PENELITIAN	11
4.1. Jenis Penelitian.....	11
4.2. Objek Penelitian	11
4.3. Alat dan Bahan	11
4.4. Prosedur penelitian.....	11
4.5. Teknik Analisis Data	12
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	13
5.1 Penentuan Kondisi Optimum	13
5.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Askorbat dan Asam Benzoat.....	17
5.3 Penentuan Kadar Asam Askorbat dan Asam Benzoat dalam Sampel Minuman Ringan	21
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	25
6.1 Kesimpulan	25
6.2 Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Struktur Asam Askorbat	4
Gambar 2 Struktur Asam Benzoat	7
Gambar 3. Spektrogram Asam Askorbat 50 ppm.....	13
Gambar 4. Spektrogram Asam Benzoat 50 ppm	14
Gambar 5. Kromatogram penentuan pH optimum.....	15
Gambar 6. Kromatogram penentuan variasi komposisi fasa gerak.....	16
Gambar 7. Kromatogram Blanko dan Larutan Standar.....	17
Gambar 8. Kurva Kalibrasi Asam Askorbat.....	18
Gambar 9. Kurva Kalibrasi Asam Benzoat.....	20
Gambar 10. Kromatogram kurva kalibrasi asam askorbat dan asam benzoat.....	21
Gambar 11. Kromatogram sampel minuman ringan yang dijual bebas di pasaran.....	23
Gambar 12. Kromatogram Sampel Minuman Ringan yang dijual di sekolah.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Biaya Penelitian28
Lampiran 2. Curriculum Vitae.....30
Lampiran 3. Data pengukuran kurva kalibrasi asam askorbat.....36
Lampiran 4. Data pengukuran kurva kalibrasi asam benzoat37
Lampiran 5. Rumus Perhitungan dan Hasil Perhitungan Kadar Sampel.....38

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Semakin berkembangnya ilmu pengetahuan saat ini, tingkat pengetahuan tentang teknik pemisahan pun semakin meningkat. Salah satu teknik pemisahan yang sering digunakan adalah kromatografi. Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fasa gerak dan fasa diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan.

Saat ini teknik kromatografi yang paling banyak digunakan untuk fasa cair adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau biasa dikenal dengan *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Karena analisa dengan HPLC cepat, daya pisah baik, persiapan sampel mudah dan dapat dihubungkan dengan detektor yang sesuai.

HPLC dapat digunakan untuk mengisolasi zat tidak mudah menguap dan zat yang secara termal tidak stabil (Khopkar, 2003:168). HPLC juga dapat digunakan untuk penentuan zat-zat organik yang ada didalam makanan seperti asam benzoat dan asam askorbat.

Asam benzoat merupakan suatu bahan pengawet yang sering digunakan didalam minuman ringan. Bahan pengawet merupakan bahan kimia yang berfungsi untuk memperlambat kerusakan makanan baik yang disebabkan mikroba pembusuk, bakteri, ragi, maupun jamur dengan cara menghambat, mencegah, menghentikan proses pembusukan dan fermentasi dari bahan makanan.

Pemakaian asam benzoat dari satu sisi menguntungkan karena dengan penambahan asam benzoat makanan dan minuman dapat dibebaskan dari mikroba pembusuk, namun dari sisi lain, penggunaan asam benzoat sebagai pengawet dapat menimbulkan efek buruk

terhadap kesehatan bagi pemakainya apabila kadar pemakaian bahan pengawet tidak diatur dan diawasi.

Asam askorbat merupakan suatu antioksidan yang juga termasuk bahan pengawet. Zat ini ditambahkan untuk mencegah timbulnya bau tengik pada makanan yang mengandung minyak dan lemak. Asam askorbat merupakan salah satu vitamin yang larut didalam air. Asam askorbat berfungsi untuk mensintesis kolagen intraseluler mengoksidasi fenilalanin menjadi tirosin, mereduksi ion ferri menjadi ferro dalam saluran pencernaan, meningkatkan penyerapan besi dalam usus halus. Asam askorbat banyak dijumpai didalam buah-buahan dan sayur-sayuran terutama dalam keadaan segar. Sumber vitamin C yang terdapat dalam tanaman adalah bayam, jeruk, nanas, brokoli, dan lain-lain. Vitamin C yang bersumber dari hewan adalah susu, telur, daging, ikan, dan unggas (Iryani, 2003:80).

Beberapa metoda untuk penentuan vitamin C atau asam askorbat telah dilakukan, diantaranya yaitu dengan metoda titrasi menggunakan dikloroindofenol, namun metoda ini mempunyai kelemahan diantaranya bahan makanan yang mengandung senyawa-senyawa yang dapat mereduksi zat warna selain vitamin C, dan batas akhir titrasi yang tidak jelas, terutama adanya ekstrak yang mengandung pigmen (Adnan, 1997).

Penentuan kadar asam benzoat dengan metoda HPLC sebelumnya telah dilakukan oleh Arif mahasiswa Universitas Andalas. Menurut Arif (2011) "Penentuan asam benzoat dengan HPLC yang menggunakan pelarut metanol dan buffer fosfat telah mendapatkan hasil yang baik"., Pada penelitian ini dengan metoda HPLC digunakan pelarut metanol dan buffer asetat. Sekaligus untuk melihat kemampuan dan ketepatan HPLC dengan menggunakan pelarut metanol dan buffer asetat dalam penentuan asam askorbat dan asam benzoat.

1.2. Perumusan Masalah

Penelitian ini terbatas pada hal-hal berikut :

- Sampel diambil dari beberapa minuman soft drink yang dijual bebas.
- Penentuan kadar asam benzoat dan asam askorbat ditentukan secara HPLC dengan menggunakan perbandingan pelarut metanol dan buffer asetat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

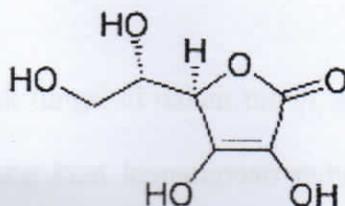
2.1. Asam Askorbat (Vitamin C)

Asam askorbat (vitamin C) adalah suatu turunan heksosa dan diklasifikasikan sebagai karbohidrat yang erat berkaitan dengan monosakarida. Vitamin C dapat disintesis dari D-glukosa dan D-galaktosa dalam tumbuh-tumbuhan dan sebagian besar hewan. Vitamin C terdapat dalam dua bentuk di alam, yaitu L-asam askorbat (bentuk tereduksi) dan L-asam dehidro askorbat (bentuk teroksidasi).

Vitamin C ditemukan dalam semua jaringan hidup dan sebagian besar hewan dapat mensintesis vitamin C dari glukosa dalam tubuhnya. Asam askorbat sangat mudah teroksidasi secara reversibel menjadi asam L-Dehidroaskorbat. Asam L-Dehidroksiaskorbat ini sangat labil dan dapat berubah menjadi asam L-diketogulonat.

Penyerapan vitamin C berlangsung di usus halus melalui transport aktif. Apabila seseorang mengkonsumsi vitamin C 30-180 mg setiap harinya maka usus akan menyerapnya kira-kira 80-90% dari jumlah yang masuk. Jika seseorang mengkonsumsi vitamin C dalam jumlah yang tinggi maka efek sampingnya terjadi diare. Kelebihan vitamin C didalam tubuh akan dibuang bersama urin, tubuh hanya mampu menahan vitamin C dalam jumlah yang sedikit (Iryani, 2003:79)

Struktur kimia asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1 Struktur Asam Askorbat

2.1.1. Sejarah

Penyakit *scurvy* telah dikenal sejak abad ke-15, yaitu penyakit yang banyak di derita oleh pelaut yang berlayar selama berbulan-bulan serta bertahan dengan makanan yang dikeringkan dan biskuit. Penyakit ini menyebabkan pucat, rasa lelah berkepanjangan diikuti oleh perdarahan gusi, perdarahan dibawah kulit, edema, tukak, dan pada akhirnya kematian.

Pada tahun 1750, Lind, seorang dokter dari Skotlandia menemukan bahwa *scurvy* dapat dicegah dan diobati dengan memakan jeruk. Baru pada tahun 1932 Szen-Gyorgyi dan C. Glenn King berhasil mengisolasi zat antiskorbut dari jaringan adrenal, jeruk, dan kol yang dinamakan vitamin C. Zat ini kemudian berhasil disintesis pada tahun 1933 oleh Haworth dan Hirst sebagai asam askorbat (Sunita, 2004 : 185).

2.1.2. Sifat

Vitamin C adalah kristal putih yang mudah larut dalam air. Dalam keadaan kering vitamin C cukup stabil, tetapi dalam keadaan larut, vitamin C mudah rusak karena bersentuhan dengan udara (oksidasi) terutama bila terkena panas. Oksidasi dipercepat dengan kehadiran tembaga dan besi. Vitamin C tidak stabil dalam larutan alkali, tetapi cukup stabil dalam larutan asam. Vitamin C adalah vitamin yang paling labil.

2.1.3. Fungsi

Vitamin C mempunyai banyak fungsi di dalam tubuh, sebagai koenzim atau kofaktor. Asam askorbat adalah bahan yang kuat kemampuan reduksinya dan bertindak sebagai antioksidan dalam reaksi-reaksi hidroksilasi. Beberapa turunan vitamin C (seperti asam eritrobik dan askorbik palmitat) digunakan sebagai antioksidan di dalam industri pangan

untuk mencegah proses menjadi tengik, perubahan warna pada buah-buahan dan untuk mengawetkan daging (Sunita, 2004 : 187).

Fungsi utama vitamin C adalah untuk mensintesis kolagen intra seluler. Kolagen adalah protein yang banyak terdapat dalam jaringan konektif, tulang dan pembuluh darah. Vitamin C memegang peranan penting dalam hidroksilasi prolin menjadi hidroksi prolin dan lisin menjadi hidroksilisin. Kedua senyawa ini adalah sangat penting dalam pembentukan kolagen (Iryani, 2003:80).

2.1.4. Sumber Vitamin C

Vitamin C banyak dijumpai didalam buah-buahan dan sayur-sayuran terutama dalam keadaan segar. Buah yang terlalu matang kandungan vitamin C nya lebih rendah dibanding yang mentah. Vitamin C terdapat dalam tanaman seperti bayam, brokoli, cabe hijau, jeruk, nanas, dan lain-lain. Vitamin C yang bersumber dari hewan adalah susu, telur, daging, ikan, dan unggas. Konsumsi vitamin C yang dianjurkan adalah 60 mg/hari. Defisiensi vitamin C dapat menyebabkan sariawan, pembengkakan kaki pada bagian paha, anemia dan deformasi tulang (Iryani, 2003:80).

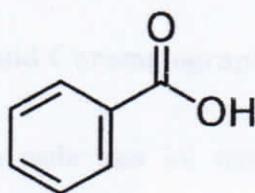
2.2. Asam Benzoat

Asam benzoat telah banyak dipergunakan sebagai zat anti mikroba di dalam makanan dan terdapat di alam dalam kayu manis, cengkeh, buah prem (prune), dan cranberry. Asam tak terdisosiasi merupakan bentuk yang mempunyai kegiatan anti mikroba, dan memperlihatkan kegiatan optimum pada selang pH 2,5-4,0 karena itu sangat cocok untuk dipergunakan di dalam makanan asam., seperti sari buah, minuman soda, dan asaman. Karena garam natrium asam benzoat lebih mudah larut di dalam air daripada bentuk asamnya, biasanya dipergunakan garam natrium. Di dalam produk sebagian garam diubah menjadi bentuk asam aktif . Asam benzoat sangat aktif terhadap khamir dan bakteri dan

kurang aktif terhadap jamur. Sering asam benzoat digabungkan dengan asam sorbat atau paraben, dan paras penggunaannya biasanya dari 0.05 sampai 0.1% bobot.

Asam benzoat tidak menyebabkan dampak yang merusak pada manusia bilamana dipergunakan dalam jumlah kecil. Asam benzoat segera dikeluarkan dari tubuh terutama setelah konyugasi dengan glisina membentuk asam hipurat (Sakidja, 1989: 492-493).

Asam benzoat memiliki struktur kimia seperti gambar 2



Gambar 2 Struktur Asam Benzoat

Asam benzoat memiliki rumus molekul C_6H_5COOH dan berat molekul 122.22 g/mol. Secara umum, asam benzoat berbentuk jarum atau sisik, putih, sedikit berbau, biasanya berbau benzaldehida atau benzoin. Adapun sifat lainnya sedikit larut dalam air, agak mudah menguap pada suhu hangat, mudah menguap dalam uap air, mudah larut dalam etanol, dalam kloroform dan eter.

2.3. Metoda Analisis Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan komponen dalam suatu campuran berdasarkan distribusi komponen antara fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa gas atau cairan dan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan.

Kromatografi dapat dibedakan atas berbagai macam, tergantung pada pengelompokkannya. Berdasarkan fase gerak, yang dapat berupa zat cair atau gas, kromatografi dapat digolongkan kromatografi cair (KC) dan kromatografi gas (KG).

Berdasarkan fasa diam, yang dapat berupa zat cair atau zat padat, kromatografi dapat digolongkan menjadi kromatografi partisi dan kromatografi jerap (Roy J, 1991).

Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi pertukaran ion, kromatografi eksklusi dan kromatografi afinitas. Berdasarkan alat yang digunakan, kromatografi dapat dibagi atas kromatografi ketas, kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), dan kromatografi gas (Sastrohamidjojo, 1985 dalam Arif, 2011).

2.3.1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC setidaknya-tidaknya pada saat ini merupakan metoda kromatografi cair paling akhir. Alat KCKT atau HPLC terdiri atas sistem pencampur pelarut yang sangat canggih yang mampu menghasilkan campuran landaian yang mengandung empat linarut yang berbeda, pompa yang mampu menghasilkan tekanan sampai 6000 psi atau 10000 psi, kolom yang mengandung fase diam (atau lebih tepat penyangga), dan sistem pendeteksi sinambung yang bermacam-macam jenisnya. Kolom yang tersedia mempunyai banyak sekali pelat teori (lebih dari 100.000 untuk kolom 100 cm), dan kromatografi dilakukan dalam kondisi yang mendekati kondisi ideal demikian rupa sehingga dapat diperoleh pemisahan yang baik, seringkali hasil dapat diperoleh dalam waktu beberapa menit dan ditafsirkan secara kuantitatif dengan ketepatan yang lumayan.

HPLC mempunyai pembatas yang sebanding dengan kromatografi gas, yaitu cuplikan harus larut di dalam zat cair. Akan tetapi ini bukan pembatas yang berat, dan setidaknya-tidaknya HPLC dapat dipakai untuk sebagian besar senyawa tak atsiri dan senyawa berbobot molekul tinggi. Selain itu, HPLC dapat dipakai untuk senyawa anorganik, yang sebagian besar tidak atsiri. HPLC biasanya dilakukan pada suhu kamar. Jadi senyawa yang tidak tahan panas dapat ditangani dengan mudah.

Pada metoda HPLC terdapat sistem kromatografi normal dan kromatografi balik. Dari kedua fase, yaitu fase fase diam dan fase gerak, salah satu diantaranya selalu harus lebih polar daripada yang lainnya. Misalnya, heksana yang dipakai pada kolom silika kepolarannya jauh lebih rendah daripada permukaan silika. Jika fase yang lebih polar itu fase diam, ini disebut kromatografi normal. Jika fase yang kepolarannya lebih rendah ialah fasa diam, ini dikenal sebagai kromatografi fase balik (Roy J.1991).

2.3.2 Penentuan kadar asam benzoat dan asam askorbat 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 asam benzoat dan asam askorbat menggunakan kromatografi merupakan salah satu cara yang cepat dan akurat dalam penentuan zat-zat aditif dalam makanan dan minuman.

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah (1) mencari kondisi optimum penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat secara HPLC; (2) menentukan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada beberapa minuman soft drink yang dijual bebas dengan menggunakan pelarut metanol.

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 penentu kadar asam askorbat dan asam benzoat 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 telah 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, peralatan gelas, oven, kertas pH, kertas saring, neraca analitik, botol reagen, labu ukur, erlenmeyer, botol semprot, batang pengaduk, pipet tetes. Bahan yang digunakan adalah kadar asam askorbat dan asam benzoat standar, metanol, asam asetat, 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 asam benzoat dan asam askorbat; (d) Penentuan kadar asam benzoat dan asam askorbat dengan perbandingan pelarut secara HPLC.

a. Sampling minuman

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

b. Penetapan panjang gelombang pengukuran

1) Pembuatan larutan baku 10 ppm

Dibuat larutan standar dari masing-masing bahan baku pembanding dengan kadar 10 ppm untuk asam askorbat dan asam benzoat menggunakan pelarut aquadest yang sudah disaring..

2) Penetapan panjang gelombang pengukuran

Masing-masing larutan bahan baku pembanding tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer, lalu dibuat kurva serapannya. Kemudian ditentukan panjang gelombang untuk analisis.

c. **Penentuan kondisi optimum untuk penentuan asam benzoat dan asam askorbat secara HPLC**

Larutan campuran bahan baku pembanding asam benzoat dan asam askorbat di dalam pelarut aquades, disuntikan sebanyak 20 μ l ke dalam kolom menggunakan fase gerak campuran metanol dan air dengan bufer asetat antara pH 3 sampai 6. Dipilih komposisi dan pH yang memberikan pemisahan terbaik berdasarkan waktu retensi (t_R), resolusi (R), HETP dan jumlah pelat teoritis (N).

d. **Penentuan kadar asam benzoat dan asam askorbat secara HPLC**

Kondisi terpilih kemudian digunakan pada analisis sampel sebagai aplikasi.

4.5. Teknik Analisis Data

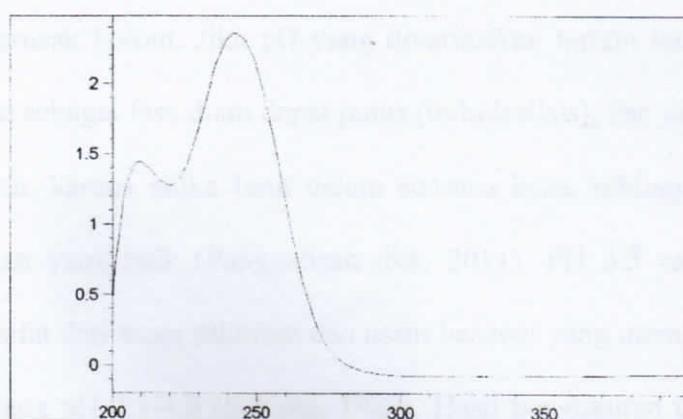
Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah data kualitatif dengan melihat luas daerah dari asam benzoat dan asam askorbat pada kromatogram HPLC, kemudian ditentukan kadarnya dengan menggunakan kurva linear dari larutan standar.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penentuan Kondisi Optimum

5.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum

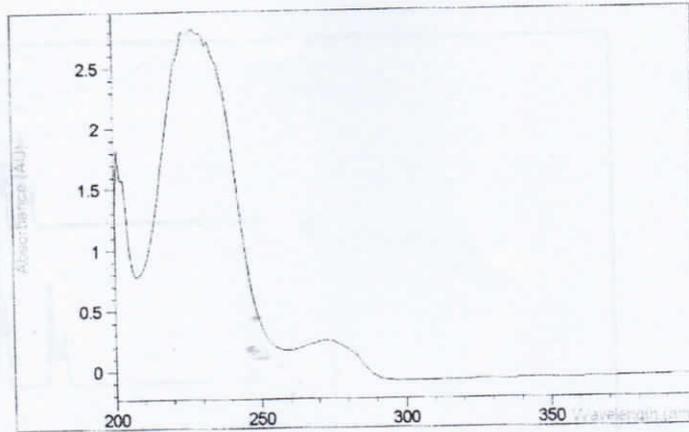
Penentuan panjang gelombang optimum dari senyawa asam askorbat dan asam benzoat bertujuan untuk melihat pada panjang gelombang berapakah kedua senyawa tersebut dapat memberikan penyerapan yang baik sehingga pemisahan dengan HPLC dapat dilakukan. Penyerapan yang paling baik ditandai dengan terbentuknya puncak paling tinggi pada spektrogram. Penentuan panjang gelombang optimum ini ditentukan dengan mengukur serapan larutan asam askorbat dan asam benzoat dengan konsentrasi masing-masing 50 ppm pada panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV. Dari hasil pengukuran diperoleh panjang gelombang maksimum asam askorbat adalah 245 nm, dan panjang gelombang maksimum untuk asam benzoat adalah 230 nm. Untuk itu pada penelitian ini digunakan panjang gelombang 240 nm, sehingga kedua senyawa masih dapat terdeteksi dan memberikan penyerapan yang baik. Hasil dari pengukuran kedua senyawa tersebut dapat dilihat pada gambar berikut:



Sample/Result Table

#	Name	Abs<245nm>
1	50ppm vit C	2.32930

Gambar 3. Spektrogram Asam Askorbat 50 ppm



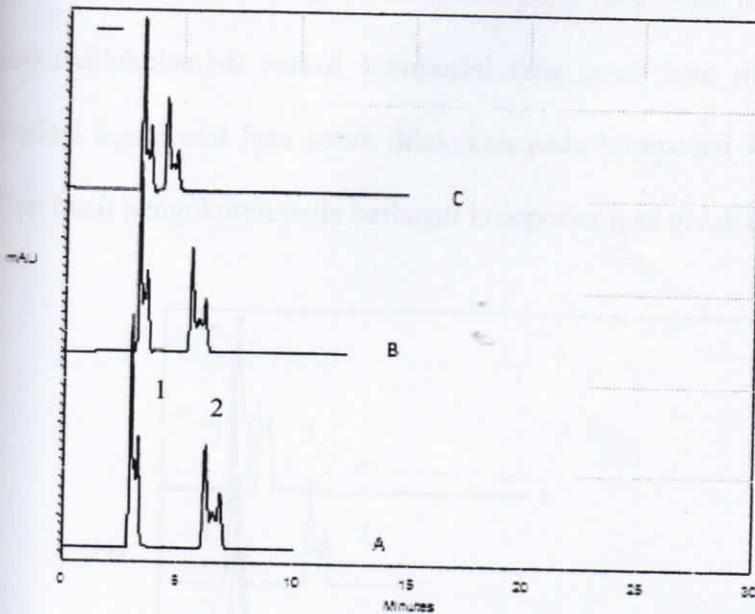
Sample/Result Table

#	Name	Abs<230nm>
1	Benzoat 50ppm	2.78120

Gambar 4. Spektrogram Asam Benzoat 50 ppm

5.1.2 Penentuan PH Optimum Buffer Asetat Sebagai Komponen Fasa Gerak

Penentuan pH optimum dilakukan untuk mendapatkan hasil analisa yang optimum untuk pemisahan asam askorbat dan asam benzoat. Penentuan pH optimum dilakukan pada komposisi fasa gerak 50:50 dengan waktu retensi 30 menit, laju alir 1 ml/min, menggunakan kolom C_{18} , $\lambda=240$ nm. Untuk memperoleh pH optimum, maka pH divariasikan pada pH 3.5, 4.5, dan 5.5. pemilihan variasi pH dilakukan secara selektif agar tidak merusak kolom. Jika pH yang divariasikan terlalu rendah maka ikatan silika yang berfungsi sebagai fasa diam dapat putus (terhidrolisis), dan jika pH terlalu basa maka silika akan larut, karena silika larut dalam suasana basa, sehingga tidak akan diperoleh hasil pemisahan yang baik (Panggabean dkk, 2011). PH 3.5 yang diperoleh ternyata sesuai dengan sifat dari asam askorbat dan asam benzoat yang memperlihatkan kegiatan optimum pada selang pH 2.5-4.0 (Sakidja, 1989). Hasil pengukuran untuk penentuan pH optimum dapat dilihat pada Gambar 5.



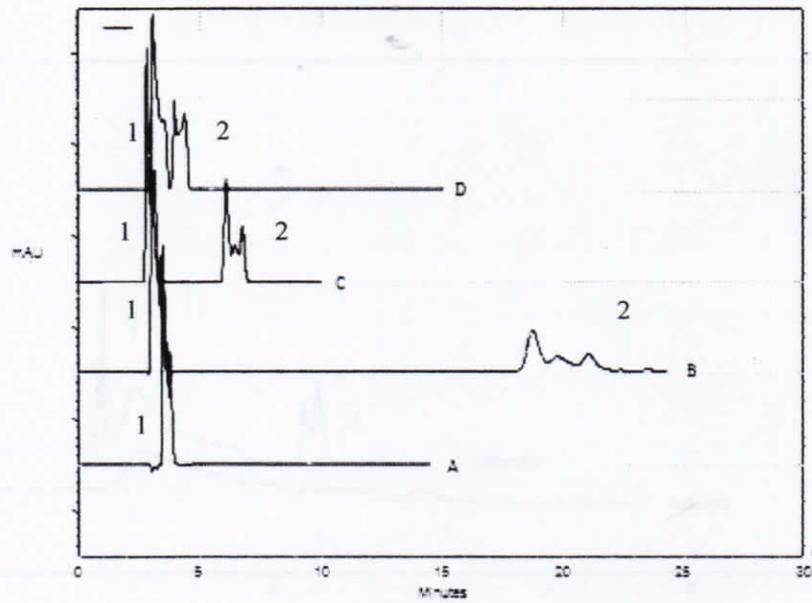
Gambar 5. Kromatogram penentuan pH optimum
 Laju alir 1 ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:buffer asetat (50:50)
 A; metanol:buffer asetat pH 3.5, B; metanol:buffer asetat pH 4.5, C; metanol :buffer asetat pH 5.5, 1) Asam askorbat, 2) Asam Benzoat.

Dari kromatogram di atas dapat dilihat bahwa pada pH 3.5 telah terjadi pemisahan yang baik untuk pemisahan asam askorbat dan asam benzoat, karena perbedaan waktu retensi antara kedua senyawa cukup lama, yaitu waktu retensi untuk asam askorbat pada 2.93 mnt dan asam benzoat muncul pada 6.2 mnt. Untuk itu digunakan pH 3.5 sebagai pH optimum pada penelitian ini.

5.1.3 Penentuan Komposisi Fasa Gerak Optimum

Fasa gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran dari metanol dan buffer asetat. Penelitian ini menggunakan fasa terbalik, yaitu fasa gerak yang digunakan lebih polar bila dibandingkan dengan fasa diam yang bersifat non polar, karena pada penelitian ini senyawa yang akan dianalisa bersifat polar. Dari gambar 5 diatas dapat dilihat komposisi fasa gerak 50:50 pada pH 3.5 telah terjadi pemisahan yang baik. Pada kondisi tersebut asam askorbat memberikan waktu retensi 2.93 hal ini bersamaan dengan munculnya *system peak*, yaitu puncak yang muncul meskipun tidak ada sampel yang

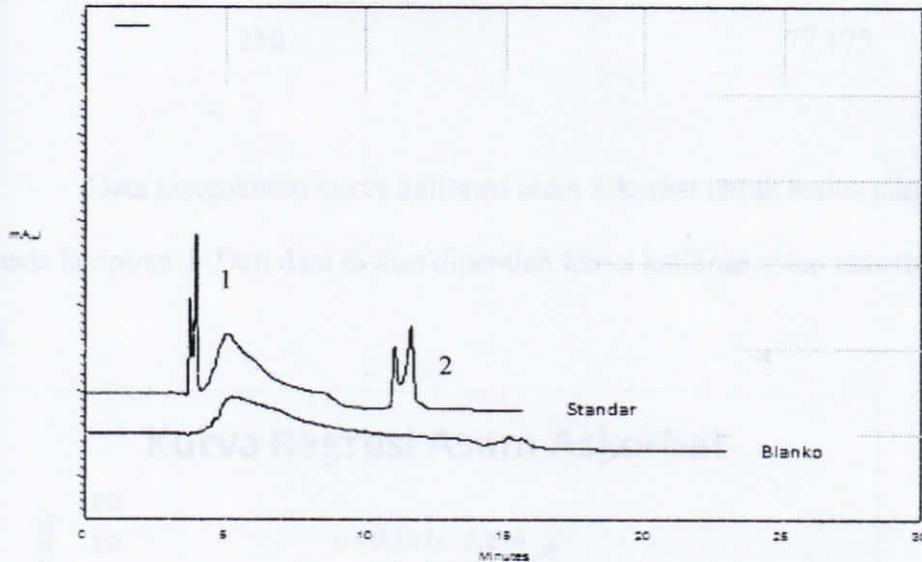
diinjeksikan. Untuk menghindari *system peak* yang dapat mengganggu puncak dari sampel, maka dilakukanlah variasi komposisi fasa gerak agar diperoleh pemisahan yang baik. Variasi komposisi fasa gerak dilakukan pada komposisi 10:90, 30:70, 50:50, dan 70:30. Dari hasil pengukuran pada berbagai komposisi fasa gerak dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 6. Kromatogram penentuan variasi komposisi fasa gerak
 Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:buffer asetat (3.5)
 A; metanol:buffer asetat (10:90), B; metanol:buffer asetat (30:70), C; metanol:buffer asetat (50:50), D; metanol :buffer asetat (70:30), 1) Asam askorbat, 2) Asam Benzoat

Dari kromatogram di atas dapat kita lihat bahwa asam askorbat pada komposisi fasa gerak 30:70, 50:50 dan 70:30 memberikan waktu retensi yang sama yaitu 2.9, sedangkan pada komposisi fasa gerak 10:90 asam askorbat muncul pada waktu retensi 3.45. Pada komposisi 10:90 asam benzoat muncul pada waktu retensi yang sangat lama, untuk memperpendek waktu retensi asam benzoate agar didapatkan puncak dalam waktu sekitar 10 menit, maka dilakukan elusi gradien, yaitu perubahan komposisi fasa gerak selama elusi. Elusi gradien dimulai pada komposisi 5:95 hingga 50:50 selama 5 menit dan setelah terjadi elusi maka komposisi fasa gerak akan konstan pada 50:50, komposisi inilah yang

digunakan sebagai komposisi optimum dari fasa gerak agar diperoleh pemisahan yang baik. Hasil pemisahan dengan kondisi ini dapat dilihat pada Gambar 7, yaitu waktu retensi untuk asam askorbat adalah 3.73 mnt dan waktu retensi untuk asam benzoat adalah 11.07 mnt. Kondisi ini dipakai untuk penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada sampel minuman ringan.



Gambar 7. Kromatogram Blanko dan Larutan Standar

Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak methanol:buffer asetat (5:95), pH 3.5, 1) Asam askorbat, 2) Asam benzoat.

5.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Askorbat dan Asam Benzoat

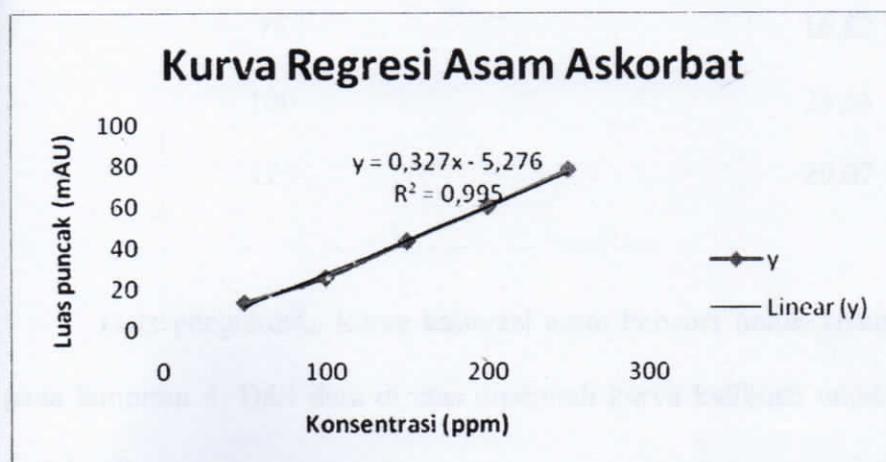
5.2.1 Kurva Kalibrasi Asam Askorbat

Pembuatan kurva kalibrasi asam askorbat bertujuan untuk mengetahui kadar asam askorbat di dalam sampel yang akan dianalisa. Pembuatan kurva kalibrasi untuk asam askorbat dilakukan dengan pengukuran sederetan larutan standar dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm. Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum yang telah diperoleh sebelumnya yaitu pada komposisi fasa gerak 5:95 (elusi gradien) dan pH 3.5. Hasil dari pengukuran dapat dilihat pada Tabel 1 berikut:

Tabel 1. Data pembuatan kurva kalibrasi asam askorbat

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak (mAUxmnt)
50	13.194
100	25.217
150	43.140
200	59.819
250	77.175

Data pengukuran kurva kalibrasi asam askorbat untuk kedua puncak dapat dilihat pada lampiran 3. Dari data di atas diperoleh kurva kalibrasi asam askorbat seperti Gambar 8.



Gambar 8. Kurva Kalibrasi Asam Askorbat

Laju alir 1 ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C₁₈, Fasa gerak Metanol:Buffer Asetat(5:95), pH 3.

Berdasarkan hasil pengukuran, didapatkan persamaan regresi dari asam askorbat adalah $y=0.327x-5.276$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) =0.995. Nilai koefisien determinasi yang diperoleh menunjukkan hasil yang baik karena mendekati nilai 1. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa terdapat hubungan yang linear antara konsentrasi asam askorbat dan luas puncak yang terukur dimana semua titik hasil pengukuran terdapat pada satu garis lurus.

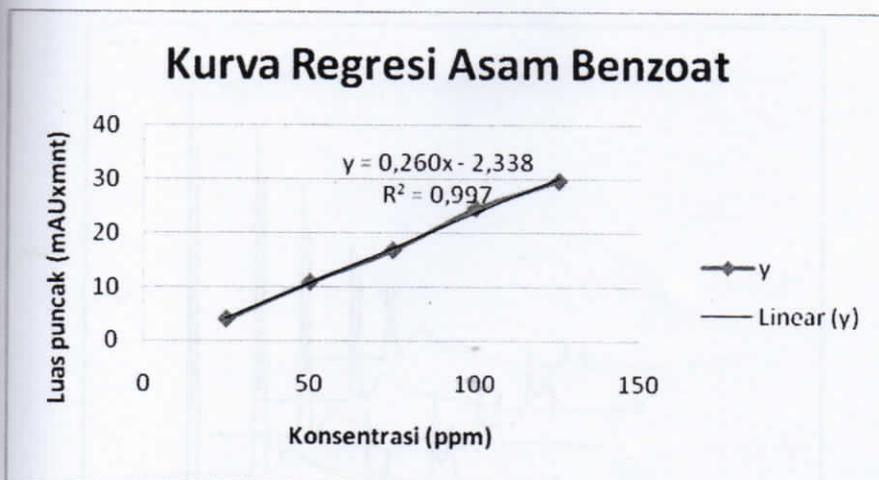
5.2.2 Kurva Kalibrasi Asam Benzoat

Pembuatan kurva kalibrasi asam benzoat bertujuan untuk mengetahui kadar asam benzoat di dalam sampel yang akan dianalisa. Pembuatan kurva kalibrasi untuk asam benzoat dilakukan dengan pengukuran sederetan larutan standar pada konsentrasi 25, 50, 75, 100 dan 125 ppm. Pengukuran dilakukan pada kondisi optimum yang telah diperoleh sebelumnya yaitu pada komposisi fasa gerak 5:95 (elusi gradien) dan pH 3.5. Hasil pengukuran pembuatan kurva kalibrasi asam benzoat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data pembuatan kurva kalibrasi Asam Benzoat

Konsentrasi (ppm)	Luas puncak (mAUxmnt)
25	4.005
50	10.84
75	16.82
100	24.58
125	29.67

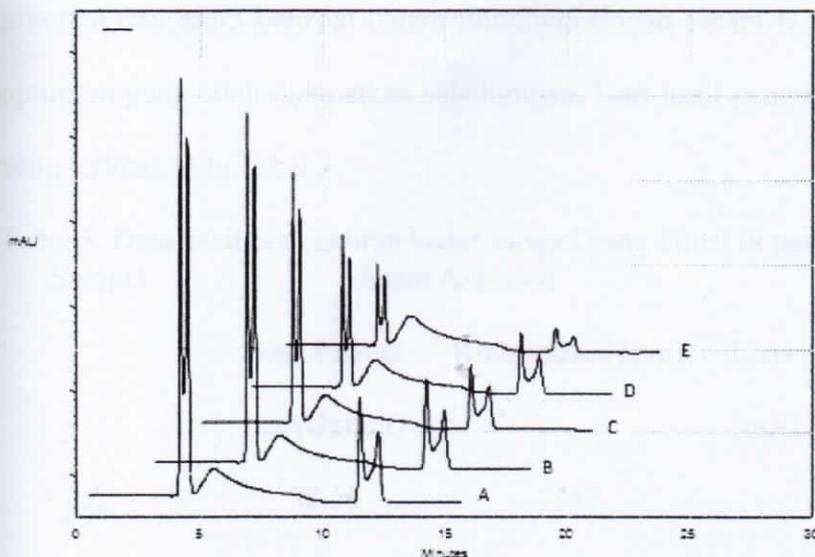
Data pengukuran kurva kalibrasi asam benzoat untuk kedua puncak dapat dilihat pada lampiran 4. Dari data di atas diperoleh kurva kalibrasi untuk asam benzoat seperti Gambar 9.



Gambar 9. Kurva Kalibrasi Asam Benzoat

Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:Buffer Asetat (5:95), pH 3.5

Berdasarkan hasil pengukuran, didapatkan persamaan regresi dari asam benzoat adalah $y=0.260x-2.338$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) =0.997. Nilai koefisien determinasi yang diperoleh menunjukkan hasil yang baik karena mendekati nilai 1. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa terdapat hubungan yang linear antara konsentrasi asam benzoat dan luas puncak yang terukur dimana semua titik hasil pengukuran terdapat pada satu garis lurus. Kromatogram hasil pengukuran kurva kalibrasi kedua senyawa dapat dilihat pada Gambar 10, dimana dari kromatogram dapat dilihat semakin tinggi konsentrasi senyawa yang diukur maka puncak akan semakin tinggi, dan semakin rendah konsentrasi senyawa yang diukur maka puncak juga akan rendah. Dapat dikatakan bahwa hubungan antara konsentrasi dengan tinggi puncak berbanding lurus.



Gambar 10. Kromatogram kurva kalibrasi asam askorbat dan asam benzoat
 Laju alir 1ml/mnt, $\lambda = 240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:buffer asetat (5:95) pH 3.5
 A;asam askorbat : asam benzoat (250:125), B:asam askorbat: asam benzoat (200:100), C;asam askorbat:asam benzoat (150:75), D;asam askorbat: asam benzoat (100:50), E;asam askorbat:asam benzoat (50:25)

5.3 Penentuan Kadar Asam Askorbat dan Asam Benzoat dalam Sampel Minuman Ringan

Pada penelitian ini minuman ringan yang akan dianalisa kandungan asam askorbat dan asam benzoatnya dipilih secara acak berdasarkan merek minuman ringan yang dijual bebas dipasaran dan dilingkungan sekolah. Kadar asam askorbat dan asam benzoat pada sampel minuman ringan dapat ditentukan dari persamaan regresi. Dalam penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat, analisa kualitatif dilakukan berdasarkan waktu retensi dan analisa kuantitatif berdasarkan luas puncak. Untuk kemudahan analisis sampel yang akan dianalisa kandungan asam askorbat dan asam benzoatnya diencerkan hingga 10x.

5.3.1 Minuman ringan yang dijual bebas dipasaran

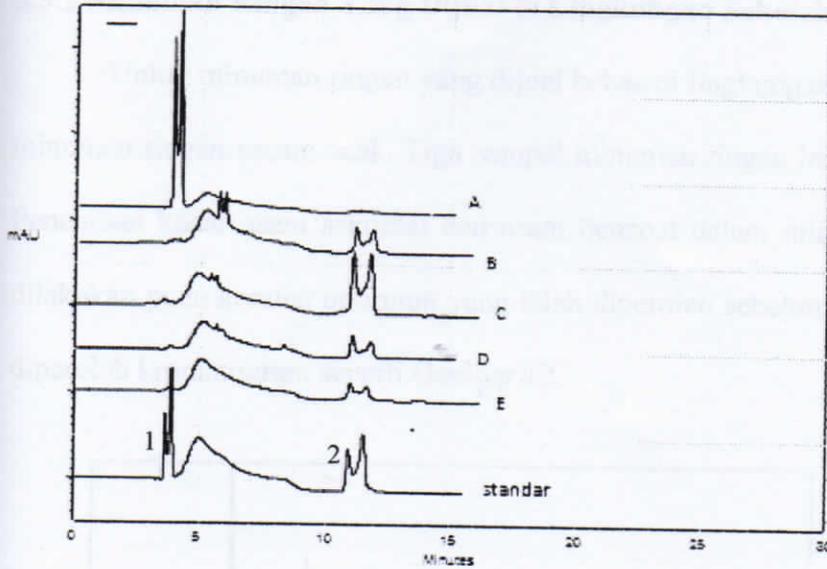
Untuk minuman ringan yang dijual bebas dipasaran, dipilih 5 merek minuman ringan yang akan dianalisa. Lima macam minuman ringan ini disimbolkan dengan huruf A, B, C, D dan E untuk kerahasiaan data dari merek minuman tersebut. Penentuan kadar asam

askorbat dan asam benzoat dalam minuman ringan secara HPLC dilakukan pada kondisi optimum yang telah didapatkan sebelumnya. Dari hasil pengukuran diperoleh data seperti yang terlihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data hasil pengukuran kadar sampel yang dijual di pasaran

Sampel	Asam Askorbat		Asam Benzoat	
	Luas Puncak (mAUxmnt)	Konsentrasi(ppm)	Luas puncak (mAUxmnt)	Konsentrasi(ppm)
A	88.55	2869	-	-
B	-	-	6.88	354
C	1.09	194	15.25	676
D	0.73	183	4.16	249
E	-	-	1.8	159

Perhitungan penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat dalam sampel minuman ringan yang dijual bebas di pasaran dapat dilihat pada lampiran 5. Kromatogram dari data di atas dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Kromatogram sampel minuman ringan yang dijual bebas di pasaran.

Laju alir 1ml/mnt, $\lambda=240$ nm, Kolom ODS C_{18} , Fasa gerak metanol:buffer asetat(5:95), pH 3.5

1)

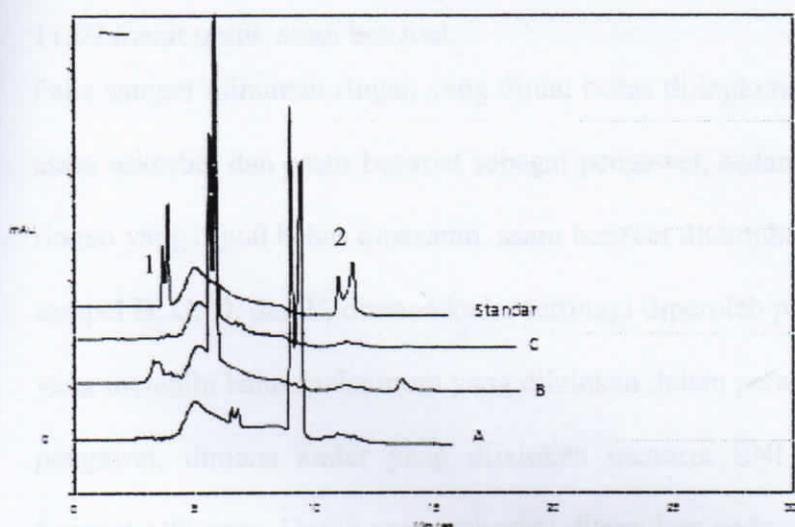
sam askorbat, 2) Asam benzoat

A

Dari data yang telah diperoleh dapat diketahui bahwa Sampel A, C dan D mengandung asam askorbat dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm, hal ini tidak berbahaya karena asam askorbat apabila dikonsumsi melebihi yang dibutuhkan oleh tubuh akan dikeluarkan bersama urin, sedangkan Sampel B dan E tidak mengandung asam askorbat. Sampel B, C, D dan E mengandung asam benzoat sebagai pengawet dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel C yaitu 676 ppm, kandungan ini telah melewati ambang batas maksimum yang diizinkan untuk pemakaian asam benzoat sebagai bahan pengawet. Berdasarkan SNI 01-0222-1995 pemakaian asam benzoat yang diizinkan adalah 600 mg/L. Dan kandungan asam benzoat yang terendah pada sampel E yaitu 159 ppm.

5.3.2 Minuman Ringan Yang Dijual di Lingkungan Sekolah

Untuk minuman ringan yang dijual bebas di lingkungan sekolah dipilih tiga sampel minuman ringan secara acak. Tiga sampel minuman ringan ini diberi simbol A, B dan C. Penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat dalam minuman ringan secara HPLC dilakukan pada kondisi optimum yang telah diperoleh sebelumnya. Dari hasil pengukuran diperoleh kromatogram seperti Gambar 12.



Gambar 12. Kromatogram Sampel Minuman Ringan yang dijual di sekolah

Laju alir 1 ml/min, $\lambda=240$ nm, Kolom C_{18} , Fasa gerak metanol:buffer asetat (5:95), pH 3.5

1)

Asam askorbat, 2) Asam benzoat

A

Dari kromatogram di atas dapat dilihat pada semua sampel tidak terdapat asam askorbat dan asam benzoat sebagai pengawet. Ini ditandai dengan tidak munculnya puncak pada sampel dengan waktu retensi yang sama dengan asam askorbat maupun asam benzoat.

BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan:

1. Kondisi optimum pada penentuan kadar asam askorbat dan asam benzoat pada minuman ringan secara HPLC yaitu menggunakan kolom ODS C₁₈, laju alir 1 ml/mnt pada panjang gelombang 240 nm, secara elusi gradien pada komposisi fasa gerak metanol:buffer asetat 5:95 dan akan konstan pada komposisi 50:50 pada waktu 5 menit dengan pH buffer asetat 3.5, dengan waktu retensi asam askorbat adalah 3.73 menit dan 11.07 menit untuk asam benzoat.
2. Pada sampel minuman ringan yang dijual bebas dilingkungan sekolah tidak ditemukan asam askorbat dan asam benzoat sebagai pengawet, sedangkan pada sampel minuman ringan yang dijual bebas dipasaran, asam benzoat ditemukan dalam empat sampel yaitu sampel B, C, D, dan E, dimana kadar tertinggi diperoleh pada sampel C yaitu 676 ppm yang melebihi batas maksimum yang diizinkan dalam pemakaian asam benzoat sebagai pengawet, dimana kadar yang diizinkan menurut SNI 01-0222-1995 untuk asam benzoat 600 ppm. Untuk asam askorbat ditemukan pada sampel A, C dan D. Dimana kadar tertinggi terdapat pada sampel A yaitu 2869 ppm.

6.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan untuk:

1. Menggunakan fasa gerak yang lebih semipolar pada penelitian asam askorbat agar diperoleh waktu retensi yang lebih lama.
2. Disarankan untuk melakukan penentuan jenis pengawet lainnya, serta menggunakan bahan baku pembanding dalam bentuk garam.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan Moehammad.1997. *Teknik Kromatografi Untuk Analisis bahan makanan*. Yogyakarta: Andi.
- C.M. Lino, A. Pena, (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.
- Hayun, Yahdiana H., Citra N.A., (2004), Penetapan kadar sakarin, asam benzoate, asam sorbet, kafeina dan aspartame di dalam beberapa minuman ringan bersoda secara kromatografi cair kinerja tinggi., *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol 1, No 3, 148-159.
- Iryani. 2003. *Kimia Pangan*. Padang: FMIPA UNP
- J.W. Weyland, H. Rolink, D.A. Doornbos, (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, 1 October 1982, 221-229.
- Roy J. Gritter dkk, 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: ITB.
- Sakidja M.S, 1989. *Kimia Pangan*. Jakarta : Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Sunita Almsier. 2004. *Prinsip dasar ilmu gizi*: Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Qing-Chuan Chen, Jing Wang, (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.
- Weiss, Joachim, *Ion Chromatography*, 2 ed. 1995
- www.wikipedia.org dan beberapa sumber internet lainnya.