

VALIDASI METODE DALAM PENENTUAN KADAR ETANOL PADA ARAK DENGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI GAS DETEKTOR IONISASI NYALA

N. P. Widya Astuti^{1*}, N. M. Suaniti², I G. Mustika³

¹Program Studi Kesehatan Masyarakat, Universitas Dhyana Pura

²Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Udayana

³Program Studi Ilmu Gizi, Universitas Dhyana Pura

*Email : widyaastuti@undhirabali.ac.id

ABSTRAK

Arak merupakan hasil destilasi dari nira kelapa. Arak banyak di produksi di Kecamatan Sidemen, Karangsem Bali. Produksi arak dilakukan secara tradisional sehingga belum diketahui dengan jelas kadar etanol yang ada dalam arak tersebut. Metode kromatografi dapat digunakan sebagai metode dalam menentukan kadar etanol dalam arak. Metode kromatografi dapat digunakan apabila telah dilakukan validasi. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala untuk menentukan kadar etanol dalam arak. Kondisi kromatografi yang dipilih yaitu suhu injektor 250⁰C, suhu detektor 300⁰C, dengan split rasio 20. Suhu awal kolom 50⁰ C ditahan dua menit pada suhu tersebut, ditingkatkan secara bertahap sebesar 10⁰ C/menit sampai suhu mencapai 220⁰ C dan ditahan selama lima menit. Laju alir dari kolom yang terpilih adalah 0,7 mL/menit. Laju alir gas helium 40 mL/ menit, laju alir nitrogen 50 mL/ menit dan laju udara sebagai pengoksida 450 mL/menit. Senyawa standar yang digunakan dalam melakukan validasi yaitu metanol, etanol dan butanol. Standar internal yang digunakan yaitu butanol. Hasil validasi metode kromatografi gas yang diperoleh yaitu nilai resolusi $R_s > 1,5$, koefisien korelasi metanol 0,9998; etanol 0,9998 dan asam asetat 0,9855. Batas deteksi dari masing – masing standar yaitu metanol 0,1059 ng; etanol 0,1688 ng. Nilai ketelitian ditentukan dari koefisien variasi dari masing – masing standar yaitu metanol 0,7%; etanol 1,8%. Sedangkan nilai ketepatan yaitu metanol 3,54%; etanol 3,53%

Kata kunci : Arak, Etanol, Kromatografi Gas, Detektor Ionisasi Nyala, Validasi Metode

ABSTRACT

Arak is the result of distillation from coconut palm. Arak is much in production in Sidemen Sub-district, Karangsem Regency, Bali. The production of arak is done traditionally so it is not known clearly the level of ethanol level in this palm wine. The chromatographic method can be used as a method of determining the ethanol content in the wine. Chromatographic method can be used if validation has been done. This study aimed at validating the gas chromatography method with a flame ionization detector to determine the ethanol level in the wine. The chromatographic conditions selected were the temperature of the injector 250⁰C, the detector temperature by 300⁰C, with a split ratio of 20. The initial temperature of the 50⁰ C column was held two minutes at that temperature, gradually increased by 10⁰ C / minute until the temperature reached 220⁰ C and held for five minutes. The flow rate of the selected column was 0.7 mL / minute. 40 mL / minute helium gas flow rate, 50 mL / minute nitrogen flow rate and air rate as a 450 mL / minute oxide. Standard compounds used in the validation were methanol, ethanol and butanol. Internal standard used was butanol. The result of gas chromatography method validation was $R_s > 1,5$, methanol correlation coefficient by 0,9998; ethanol 0.9998 and acetic acid was by 0.9274. The detection limit of each standard was methanol 0.1059 ng; ethanol 0.1688 ng. The precision value was determined from the coefficient of variation from each standard i.e 0.7% methanol; ethanol 1.8%. While the value of precision ws methanol 3.54%; ethanol 3.53%

Keywords: Arak, Ethanol, Gas Chromatography, Flame Ionization Detector, Validation Method

PENDAHULUAN

Arak merupakan minuman beralkohol yang digunakan dalam beberapa upacara

keagamaan di Bali. Kecamatan Sidemen, Karangsem merupakan saah satu tempat produksi arak di Bali. Arak dihasilkan dari proses didestilasi dari nira kelapa yang telah

difermentasi. Arak di produksi dengan cara tradisional tanpa dilakukan analisis kadar alkohol yang dihasilkan dari proses tersebut sehingga perlu dilakukan analisis terhadap kandungan alhokol dari arak.

Dalam menentukan kadar etanol dalam arak diperlukan metode yang benar sehingga hasil yang diperoleh tepat dan akurat. Metode kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala merupakan metode yang tepat dalam menentukan kadar etanol di dalam arak karena digunakan dalam pemisahan zat organik atau anorganik yang mempunyai sifat mudah menguap (Tagliaro, 1992). Penelitian sebelumnya menggunakan metode ini untuk menentukan kandungan etanol pada wine. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 30 kandungan senyawa volatil pada wine. Kandungan senyawa volatil yang dianalisis yaitu asetaldehid, 2,3-butanedione, aseton, alkohol, asam asetat, asam lemak dan 3-etil ester (Ortega *et al.*, 2001).

Metode ini banyak dimodifikasi sehingga signifikan dalam menentukan konsentrasi etanol (Tagliaro, 1992). Salah satu modifikasi metode yang dilakukan yaitu dengan menambahkan standar internal pada sampel. Standar internal yang digunakan dalam kromatografi gas bervariasi sesuai dengan teknik, peralatan dan kolom yang digunakan. Senyawa yang sering digunakan sebagai standar internal yaitu *n*-propanol dan *t*-butanol (Zuba, 2002). Penggunaan standar internal bertujuan untuk membandingkan hasil kromatogram standar dengan sampel, standar internal ditambahkan pada sampel yang akan dianalisis (Cairn, 2009).

Sebelum digunakan dilakukan optimasi kondisi kromatografi gas dengan memilih sistem dan kondisi yang sesuai, sehingga mendapatkan pemisahan yang baik antara senyawa – senyawa yang akan dipisahkan. Sistem yang digunakan dalam kromatografi gas terdiri dari gas pembawa, injektor, kolom dan detektor sedangkan kondisi yang dipilih yaitu suhu injektor, suhu kolom, suhu detektor dan kecepatan alir gas. Memisahkan senyawa dengan kromatografi gas perlu diperhatikan sifat fisik komponen yang akan dipisahkan. Suatu

metode analisis dapat digunakan apabila telah dilakukan validasi meskipun metode yang akan dipakai sudah dipublikasikan pada jurnal, buku teks, dan buku resmi. Tanpa melakukan validasi pada kondisi percobaan, maka ada kemungkinan data analisis yang diperoleh menyimpang dari keadaan yang sebenarnya. Validasi metode dilakukan bertujuan untuk memberikan hasil yang mendekati kebenaran. Karakteristik analisis dalam metode GC-FID yaitu linieritas, selektivitas, ketepatan dan ketelitian. semua karakteristik dalam validasi metode tersebut digunakan untuk menentukan kualitas wine, klasifikasi dan pengontrolan terhadap proses pembuatan wine (Ortega *et al.*, 2001).

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan arak hasil produksi di Kecamatan Sidemen, Kabupaten Karangasem, Bali, metanol, etanol, butanol dan aquades.

Peralatan

Peralatan yang digunakan yaitu labu ukur 10 mL, pipet mikro, gelas beker, kromatografi gas *GC-agilent Technologies 6890-N Network GC System*, kolom *HP InnoWax* panjang 30 m; diameter 0,32 μ m dan laju alir 0,70 mL/menit, dengan fase diam polietilen glikol, detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*, FID), gas pembawa helium (He), dan *make-up* gas nitrogen (gas tambahan)

CARA KERJA

Penyiapan Larutan Standar

Larutan metanol, etanol, butanol p.a dibuat menjadi larutan 1000 ppm sebagai larutan induk. Larutan tersebut diencerkan sehingga diperoleh larutan methanol, etanol dan butanol konsentrasi 50 ppm. Larutan campuran dibuat dengan mencampurkan larutan metanol, etanol, butanol masing – masing dengan konsentrasi 1000 ppm dan perbandingan 1:1:1. Larutan campuran diencerkan untuk memperoleh konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm dan 300 ppm. Sampel arak

diencerkan 10 kali dan digunakan sebagai sampel penelitian.

Optimasi Kondisi Kromatografi Gas

Larutan metanol, etanol, butanol masing-masing dengan konsentrasi 50 ppm diinjeksikan ke dalam injektor kromatografi gas sebanyak 1,0 µL pada kondisi analisis. Setelah dipilih dan diperoleh kondisi optimum kromatografi gas. Larutan campuran metanol, etanol, butanol dengan perbandingan 1:1:1 konsentrasi 50 ppm diinjeksikan ke dalam injektor kromatografi gas sebanyak 1,0 µL. Kondisi yang optimal dipilih berdasarkan kemampuan sistem dalam pemisahan metano, etanol, butanol.

Parameter Validasi

Selektivitas

Pengujian selektivitas dilakukan dengan cara menginjeksikan metanol, etanol, butanol, dan sampel arak yang telah ditambahkan standar internal butanol masing – masing sebanyak 1,0 µL. Masing – masing larutan metanol, etanol, butanol masing – masing dengan konsentrasi 50 ppm diinjeksikan ke dalam injektor kromatografi gas sebanyak 1,0 µL. Selektivitas dikategorikan baik apabila terjadi pemisahan pada kromatogram dengan nilai $R_s \geq 1,5$

Linieritas

Uji linieritas dilakukan dengan cara satu seri konsentrasi larutan campuran 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm masing – masing diinjeksikan sebanyak 1,0 µL ke dalam injektor kromatografi gas kemudian dilakukan

pengamatan luas puncak. Data yang diperoleh dibuat persamaan regresi linier $y=bx + a$. Masing – masing injeksi diulang sebanyak 3 kali dan kemudian ditentukan koefisien determinasinya. $r^2 \geq 0,95$ maka metode tersebut memenuhi parameter linieritas.

Batas deteksi

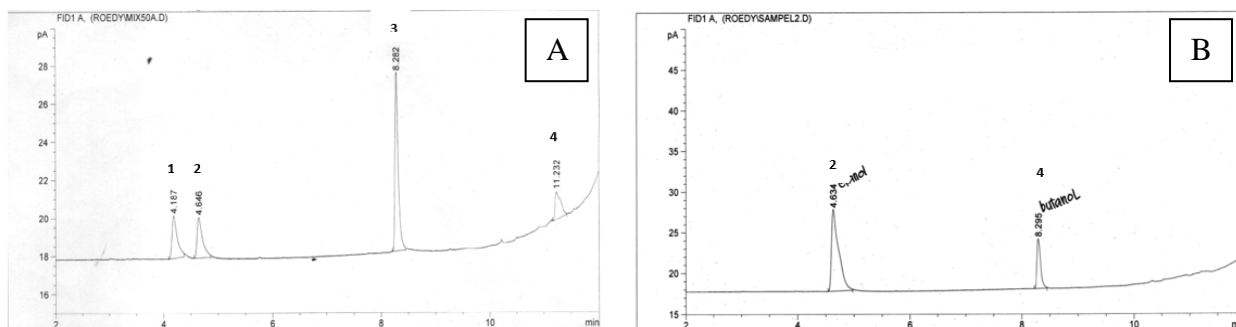
Batas deteksi ditentukan dari data persamaan regresi

Ketelitian dan ketepatan

Validasi ketelitian dan ketepatan dilakukan dengan menginjeksikan larutan campuran 50 ppm sebanyak 1,0 µL dengan replikasi sebanyak 3x. Setelah memperoleh data dihitung standar deviasi (SD), koefisien variasi (KV) dan area under curve (AUC) kromatogram etanol.

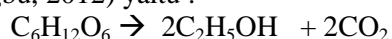
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi kondisi kromatografi gas dilakukan dengan memilih sistem dan kondisi yang sesuai, sehingga mendapatkan pemisahan yang baik antara senyawa – senyawa yang akan dipisahkan. Kondisi kromatografi gas yang dipilih dalam penelitian ini yaitu suhu injektor 250°C, suhu detektor 300°C, dengan split rasio 20. Suhu awal kolom 50°C ditahan dua menit pada suhu tersebut, ditingkatkan secara bertahap sebesar 10°C/menit sampai suhu mencapai 220°C dan ditahan selama lima menit. Laju alir dari kolom yang terpilih adalah 0,7 mL/menit. Laju alir gas helium 40 mL/ menit, laju alir nitrogen 50 mL/ menit dan laju udara sebagai pengoksidasi 450mL/menit.



Gambar 1. Kromatogram larutan standar (A) Kromatogram arak (B). (1) metanol, (2) etanol, (3) butanol, (4) asam asetat

Gambar 1 kromatogram larutan standar (A) menunjukkan kromatogram memberikan puncak pada waktu retensi 4,167 (metanol), 4,646 (etanol), 8,282 (butanol), 11,232 (asam asetat). Sedangkan pada kromatogram arak memberikan puncak pada waktu retensi 4,634 (etanol) dan 8,295 (butanol). Hasil analisis menunjukkan arak tidak mengandung metanol dan asam asetat. Hal ini disebabkan karena arak dihasilkan dari destilasi hasil fermentasi glukosa yang terkandung dalam nira kelapa. Proses fermentasi glukosa menghasilkan etanol (Otulugbu, 2012) yaitu :



Standar internal yang digunakan dalam analisis larutan standar maupun sampel yaitu butanol. Butanol mempunyai struktur kimia dan sifat – sifat fisika yang hampir sama dengan etanol. Standar internal digunakan dalam analisis kromatogram karena fluktuasi parameter – parameter instrumental dapat mempengaruhi keakuratan dalam analisis (Cairns, 2009).

Selektivitas

Nilai selektivitas hasil perhitungan senyawa standar menunjukkan nilai $R_s \geq 1,5$, hal ini didukung oleh Skoog, *et.al.* 1992 bahwa suatu senyawa akan terpisah sempurna dari senyawa – senyawa lain apabila nilai $R_s \geq 1,5$. Selain itu telah dilakukan penelitian oleh Suaniti 2011 yang menunjukkan nilai $R_s \geq 1,5$.

Nilai resolusi menunjukkan kromatografi gas telah memisahkan senyawa – senyawa dengan selektivitas yang tinggi dalam kondisi yang optimum.

Linieritas

Nilai koefisien korelasi digunakan sebagai parameter untuk menentukan linieritas. Perhitungan hasil analisis diperoleh persamaan garis regresi senyawa standar.

Hasil perhitungan ditunjukkan pada Tabel 1 dimana nilai koefisien korelasi dari senyawa standar yaitu $r \approx 1$. Menurut Suaniti *et al.*, 2008, nilai koefisien korelasi yang baik yaitu $r \approx 1$ dengan demikian detektor FID telah memberikan respon yang linier antara luas puncak dan konsentrasi sehingga hal tersebut menunjukkan bahwa alat kromatografi gas yang digunakan mempunyai linieritas tinggi. penentuan linieritas metode GC-FID yang digunakan mempunyai nilai linieritas pada rentang yang normal yaitu $r^2 = 0,9938$ dan $0,9998$. Pada penelitian Ortega 2001 nilai r^2 $0,9938 - 0,9998$ sehingga metode tersebut dapat digunakan dalam menentukan kandungan senyawa *volatile* pada *wine*.

Batas Deteksi

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Perhitungan dari hasil penelitian menunjukkan nilai batas deteksi masing – masing senyawa standar yaitu metanol = 0,1059 ng; etanol = 0,1688 ng ; asam asetat = 0,0837 ng. Batas deteksi dari masing – masing standar dibawah 5,0 ng, hal ini didukung oleh Indrayanto 1994 bahwa apabila alat kromatografi gas dapat memberi respon pada konsentrasi yang sangat kecil yaitu dibawah 5,0 ng, maka alat kromatografi gas mempunyai sensitivitas yang tinggi. Hal ini membuktikan bahwa alat kromatografi gas yang digunakan dalam penelitian mempunyai sensitivitas yang tinggi.

Ketelitian dan Ketepatan

Validasi ketelitian dapat ditentukan dari simpangan baku dan koefisien variasinya. Koefisien variasi menunjukkan suatu ketidakteelitian pengukuran. Hasil perhitungan pada Tabel 2. menunjukkan koefisien variasi masing – masing standar yaitu metanol 0,7%; etanol 1,8% dan asam asetat 1,8%.

Tabel 1. Persamaan garis regresi standar

| Standar | Persamaan garis regresi $y=bx + a$ | Koefisien korelasi (r) |
|-------------|------------------------------------|------------------------|
| Metanol | $y = 0,34x - 1,41$ | 0,9998 |
| Etanol | $y = 0,32x - 0,79$ | 0,9998 |
| Asam Asetat | $y = 0,34x - 5,08$ | 0,9855 |

Tabel 2 Data Validasi Ketelitian dan Ketepatan

| Standar | Konsentrasi sebenarnya (ng/ μ L) | Konsentrasi terukur (ng/ μ L) | | | Sb | KV (%) | K (%) |
|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|------|--------|-------|
| | | I | II | III | | | |
| Metanol | 50 | 47,8971 | 48,5761 | 48,2209 | 0,34 | 0,7 | 3,54 |
| Etanol | 50 | 47,2684 | 48,4797 | 48,9534 | 0,87 | 1,8 | 3,53 |
| Asam asetat | 50 | 50,8274 | 49,7793 | 48,2028 | 0,88 | 1,8 | 0,79 |

Koefisien variasi dari standar telah memenuhi syarat, yaitu $\leq 2\%$, hal ini didukung oleh Chapman and Hall 1983 menyatakan bahwa koefisien variasi suatu senyawa telah memenuhi syarat apabila $KV \leq 2\%$ yang menunjukkan pengukuran dengan kromatografi gas telah memberikan ketelitian dengan validitas tinggi.

Ketepatan dapat diungkapkan dengan kesalahan yaitu nilai ketepatan tergantung pada besarnya penyimpangan data dari nilai rata – rata dengan nilai sebenarnya. Uji validitas ketepatan memenuhi syarat apabila kurang dari 5% maka kromatografi yang digunakan mempunyai validitas yang tinggi (Suaniti, 2011), hal ini mendukung hasil perhitungan yang menunjukkan nilai ketepatan masing – masing senyawa standar kurang dari 5% yaitu metanol 3,54%; etanol 3,53% dan asam asetat 0,79%.

Penentuan Kadar Etanol Dalam Arak

Penentuan kadar etanol dalam arak dilakukan dengan menambahkan sampel arak dengan standar internal butanol dan dilakukan analisis menggunakan GC-FID setelah dilakukan validasi metode. Hasil analisis arak ditunjukkan pada kromatogram yang memberikan puncak pada waktu retensi retensi 4,634 (etanol) dan 8,295 (butanol). Penentuan kadar etanol pada arak dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi etanol dan diperoleh sebesar 17,88% (b/v). Hasil tersebut

menunjukkan penentuan kadar etanol pada arak menggunakan metode GC-FID yang telah divalidasi dan menggunakan standar internal butanol dapat memberikan pemisahan yang baik. Metode ini telah digunakan dan menghasilkan pemisahan yang baik setelah dilakukan validasi terhadap sensitivitas, stabilitas, linieritas, akurasi dan presisi dalam menentukan α -tokoferol pada plasma manusia (Demirkaya and Kadioglu, 2007)

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode kromatografi gas dengan menggunakan standar internal memberikan hasil dengan validasi yang tinggi yaitu nilai selektivitas dari masing – masing standar $R_s > 1,5$. Nilai linieritas ditunjukkan dengan koefisien korelasi metanol 0,9998; etanol 0,9998 dan asam asetat 0,9274. Batas deteksi yaitu metanol 0,1059 ng; etanol 0,1688 ng; asam asetat 0,0837 ng. Nilai ketelitian yaitu metanol 0,7%; etanol 1,8% dan asam asetat 1,8%. Nilai ketepatan yaitu metanol 3,54%; etanol 3,53% dan asam asetat 0,79%. Metode kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (GC-FID) yang telah dilakukan validasi dapat digunakan untuk menentukan kadar etanol dalam arak

Saran

Perlu dilakukan validasi dengan menggunakan metode lain dan mengaplikasikan pada pengukuran sampel arak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kemeterian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas bantuan dana hibah dosen pemula yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

Cairns, D. 2009. Intisari Kimia Farmasi Edisi Kedua. Penerjemah : Puspita. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari : *Essentials of Pharmaceutical Chemistry Second Edition*.

Chapman and Hall, 1983, *Statistics for Analytical Chemists*, first edition, New Fetter Lane, London.

De Martinis BS, Martin CC. 2002 Automated Headspace Solid-Phase Microextraction And Capillary Gas Chromatography Analysis Of Ethanol In Postmortem Specimens. *Forensic Sci Int.*;128:115–119

Demirkaya, F. and Kadioglu, Y. 2007. Simple GC-FID Method Development And Validation For Determination Of A - Tocopherol (Vitamin E) In Human Plasma. 363–368.

Ortega, C.. 2001 .Fast Analysis Of Important Wine Volatile Compounds Development And Validation Of A New Method Based On Gas Chromatographic – Flame Ionisation Detection Analysis Of Dichloromethane Microextracts. 923, pp. 205–214.

Skoog, D.A., West, D.M., Heller, F.J., 1992, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, sixth edition, Squanders College Publishing, London.

Suaniti, N.M., 2011, Validasi Metode Analisis Alkohol dengan Kromatografi Gas sebagai Acuan dalam Penentuan Etanol dalam Darah yang Terekspos Alkohol, *Proceeding, Jurusan*

Tagliaro F, Lubli G, Ghielmi S, 1992. Chromatographic methods for bloodalcohol determination. *J Chromatogr.*;580:161–190.

Zuba D, Parczewski A, Reichenbacher M. 2002 Optimization Of Solid-Phase Microextraction Conditions For Gas Chromatographic Determination Of Ethanol And Other Volatile Compounds In Blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*;773:75–82.