

**ANALISIS ETIL KARBAMAT DALAM MINUMAN BERALKOHOL
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

FURQONI CAHAYA MAHASTIKA

030505028Y



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN FARMASI

DEPOK

2010

**ANALISIS ETIL KARBAMAT DALAM MINUMAN BERALKOHOL
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh:

FURQONI CAHAYA MAHASTIKA

030505028Y



DEPOK

2010

SKRIPSI : ANALISIS ETIL KARBAMAT DALAM MINUMAN
BERALKOHOL SECARA KROMATOGRAFI GAS

NAMA : FURQONI CAHAYA MAHASTIKA

NPM : 030505028Y

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JANUARI 2010

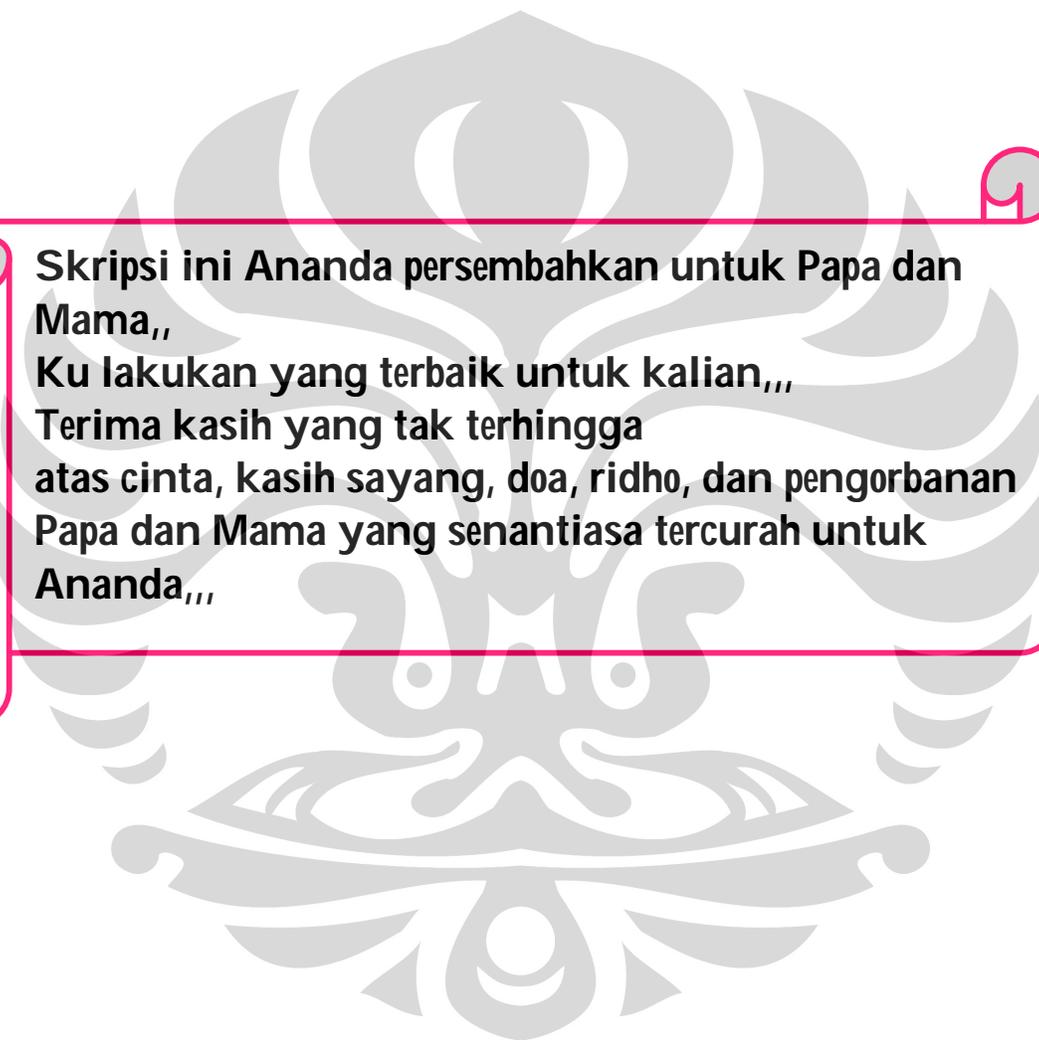

Dr. Yahdiana Harahap, M.S.

PEMBIMBING I


Dr. Harmita, Apt

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana	: 14 Januari 2010
Penguji I	: Dra. Juheini Amin, M.Si
Penguji II	: Pharm. Dr. Joshita Djajadisastra, M.S., Ph.D
Penguji III	: Dr. Herman S, M.S.



**Skripsi ini Ananda persembahkan untuk Papa dan
Mama,,
Ku lakukan yang terbaik untuk kalian,,,
Terima kasih yang tak terhingga
atas cinta, kasih sayang, doa, ridho, dan pengorbanan
Papa dan Mama yang senantiasa tercurah untuk
Ananda,,,**

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahrabbi'l'amin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia, dan nikmat-NYA yang selalu tercurah untuk penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan baik.

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, yaitu kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing I atas segala ilmu, bimbingan, saran, perhatian, serta dukungan moril yang dengan murah hati diberikan kepada penulis.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt selaku pembimbing II atas bimbingan dan saran yang sangat bermanfaat untuk penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemati, M.S., Apt selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Seluruh dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala ilmu yang diberikan selama penulis menimba ilmu di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Para laboran, terutama Bapak H. Rustam Pa'un, dan seluruh karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.

6. Papa dan Mama tercinta dan adikku tersayang (Hani) yang senantiasa memberikan cinta, kasih sayang, doa, dan dukungan kepada penulis. Senyum Papa dan Mama adalah semangat bagi penulis.
7. Sahabat terkasih penulis: Anis, Tamtam, Eko, Lina, miYE, Anne, niTa, Rizka, Uilly, Kae, Tita, Tiwi, Ika, Siti, K Livi, iQ, dan diY. Terima kasih telah mewarnai hidup penulis dengan cinta, senyum, dan tawa. Semoga persahabatan ini hingga ke Surga.
8. Teman-teman Farmasi 2005 seperjuangan: Anne, Tya, Olin, Hasma, Rezi, dan Hamka; Ekstensi 2006 & 2007: K Ingga, K Deffi, K Fuzi, K Dede, K Angel, K Fitri, K Fika, K Fabel, K DJ, K Ayu, K Erika, K Galih, K Koba. *Fighting till the end.*
9. Semua pihak lain yang belum disebutkan, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu penulis saat penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, baik dari segi ilmiah, tata bahasa, maupun penyajiannya. Besar harapan penulis bahwa skripsi ini dapat bermanfaat bagi mahasiswa farmasi pada khususnya dan kemajuan ilmu pengetahuan pada umumnya.

Depok, Januari 2010

Penulis

ABSTRAK

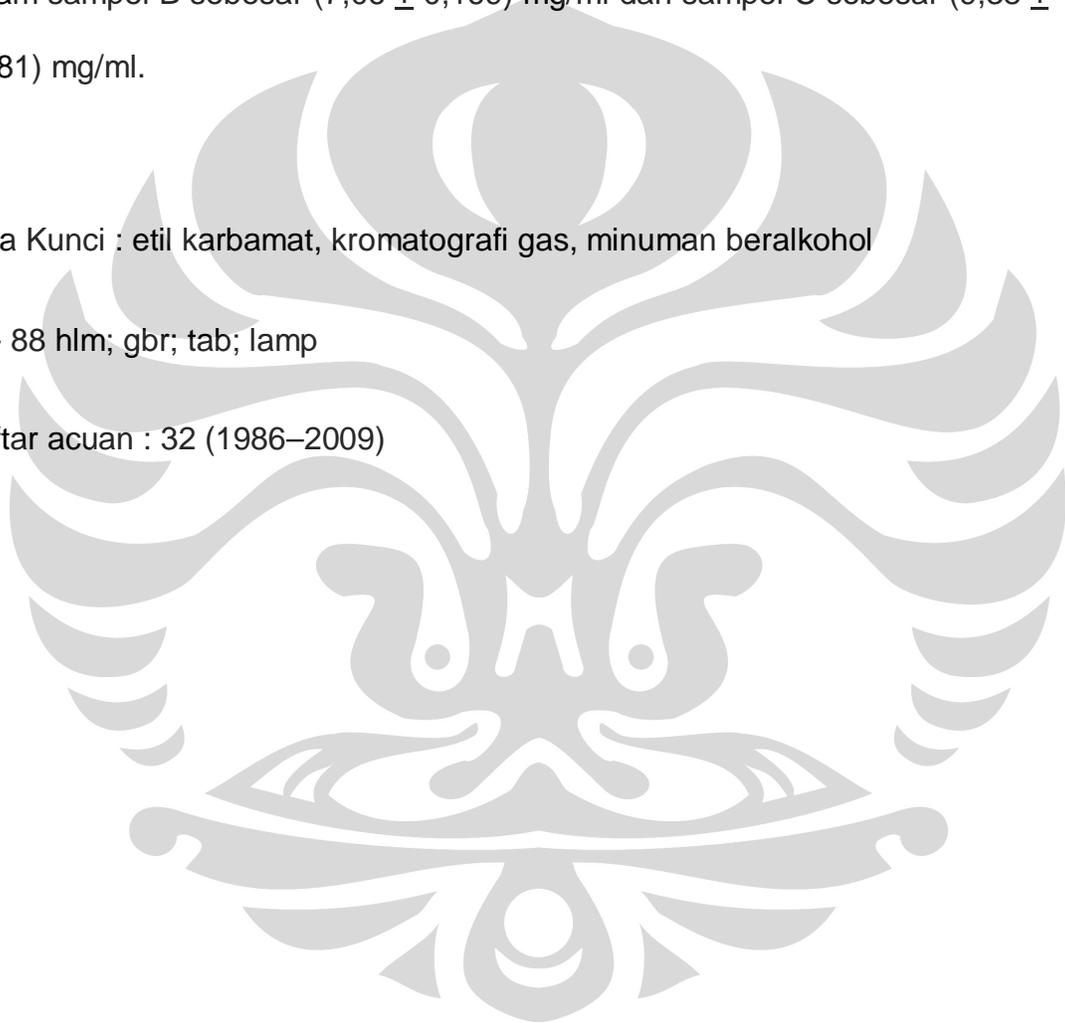
Etil karbamat atau uretan ($\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$) adalah senyawa ester etil dari asam karbamat (NH_2COOH) yang mengkontaminasi makanan dan minuman hasil fermentasi mulai dari kadar ng/l hingga mg/l. Pembentukan etil karbamat dalam minuman beralkohol terjadi secara alamiah. Jalur yang paling umum yaitu melalui reaksi urea dengan etanol. *International Agency for Research on Cancer (IARC)* menggolongkan etil karbamat ke dalam kelompok 2A (*probably carcinogenic to human*). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan menetapkan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol dengan metode kromatografi gas yang dilengkapi dengan kolom kapiler VB-Wax dan detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector / FID*). Analisis dilakukan pada suhu isothermal dengan suhu awal kolom 200°C , menggunakan helium sebagai gas pembawa dengan laju alir 0,6 ml/menit. Pengaturan suhu injektor dan suhu detektor adalah 230°C . Metode ini linier dengan koefisien korelasi 0,9990 dalam rentang konsentrasi 6004–15010 $\mu\text{g/ml}$. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) etil karbamat berturut-turut adalah 0,527 mg/ml dan 2,005 mg/ml. Metode ini divalidasi dengan koefisien variasi (KV) 0,88–1,41% dan perolehan kembali etil karbamat pada sampel A sebesar $(101,34 \pm 0,25)\%$, sampel B sebesar $(99,77 \pm 0,20)\%$, dan sampel C sebesar $(100,35 \pm 0,55)\%$. Penerapan metode ini pada tiga merek minuman beralkohol menunjukkan bahwa etil karbamat tidak terdeteksi pada

sampel dengan kandungan etanol kurang dari 5% (sampel A). Sedangkan pada sampel dengan kandungan etanol 14,7% (sampel B) dan 43% (sampel C) etil karbamat terdeteksi dengan kadar yang bervariasi, tergantung pada persentase kandungan etanol dari tiap-tiap sampel. Kadar etil karbamat dalam sampel B sebesar $(7,06 \pm 0,169)$ mg/ml dan sampel C sebesar $(9,38 \pm 0,081)$ mg/ml.

Kata Kunci : etil karbamat, kromatografi gas, minuman beralkohol

xi + 88 hlm; gbr; tab; lamp

Daftar acuan : 32 (1986–2009)



ABSTRACT

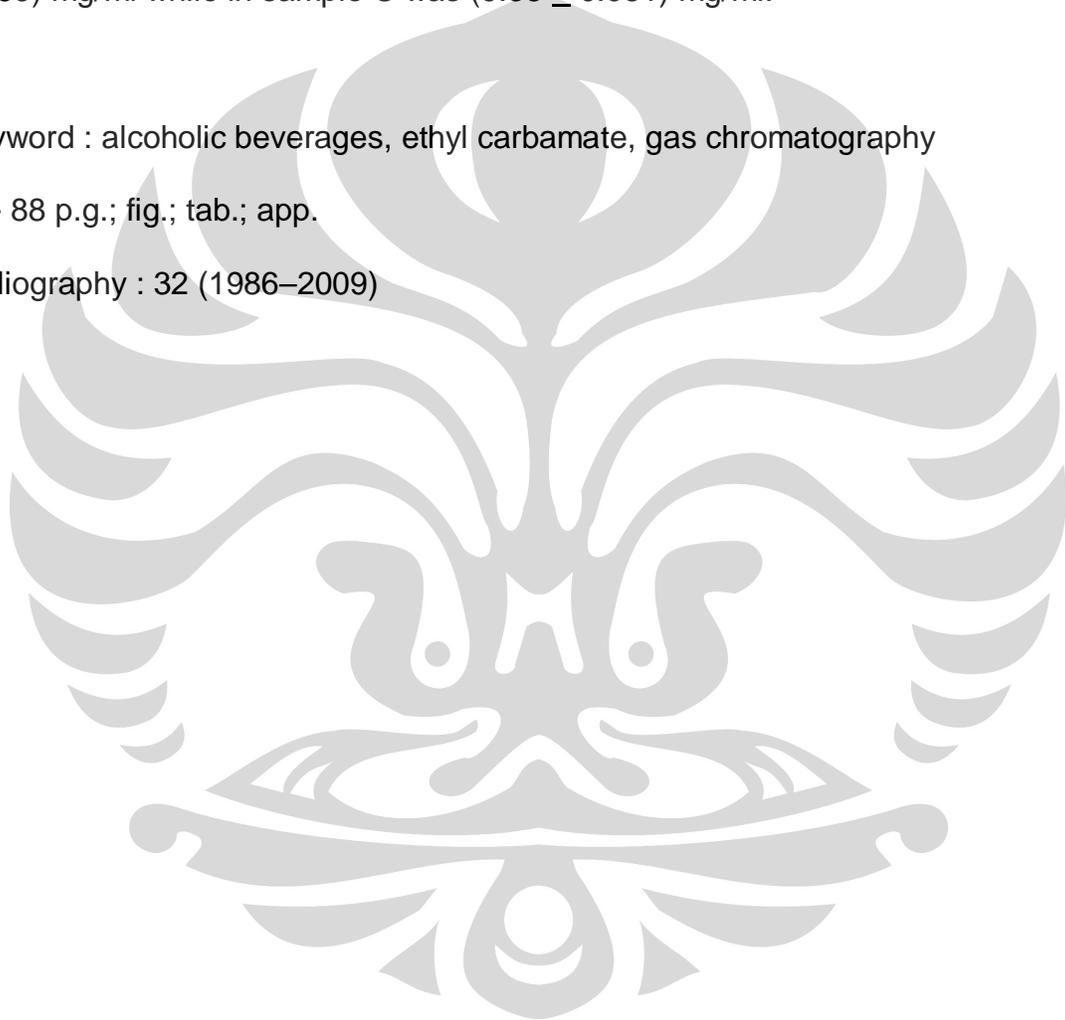
Ethyl carbamate or urethane ($\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$) is the ethyl ester of carbamic acid (NH_2COOH) that contaminate many fermented foods and beverages from ng/l to mg/l per level. The ethyl carbamate is formed naturally in alcoholic beverages. The ethyl carbamate is mostly resulted from the reaction between urea and ethanol. International Agency for Research on Cancer (IARC) classified ethyl carbamate in group 2A (probably carcinogenic to humans). The purpose of this research was to identify and quantify the concentration of ethyl carbamate in alcoholic beverages using gas chromatography (GC) with a capillary column VB-Wax and flame ionization detector (FID). This analysis was performed at isothermal temperature with column initial temperature set at 200°C , used helium as carrier gas with flow rate of 0.6 ml/min while GC injector and detector temperatures were maintained at 230°C . This method was linear with coefficient correlation of 0.9990 within concentration range of 6004–15010 $\mu\text{g/ml}$. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0,527 mg/ml and 2,005 mg/ml respectively. This method was validated with coefficient variation (CV) of 0.88–1.41% and the recovery of ethyl carbamate in sample A (101.34 ± 0.25)%, sample B (99.77 ± 0.20)%, and sample C (100.35 ± 0.55)%. The application of this method in three analysed brands of alcoholic beverages showed that in sample with concentration alcohol less than 5% (sample A)

ethyl carbamate was not detected, while in sample with concentration alcohol of 14.7% (sample B) and 43% (sample C) ethyl carbamate was detected in various concentration, depend on the percentages of alcohol concentration in each sample. The concentration of ethyl carbamate in sample B was (7.06 ± 0.169) mg/ml while in sample C was (9.38 ± 0.081) mg/ml.

Keyword : alcoholic beverages, ethyl carbamate, gas chromatography

xi + 88 p.g.; fig.; tab.; app.

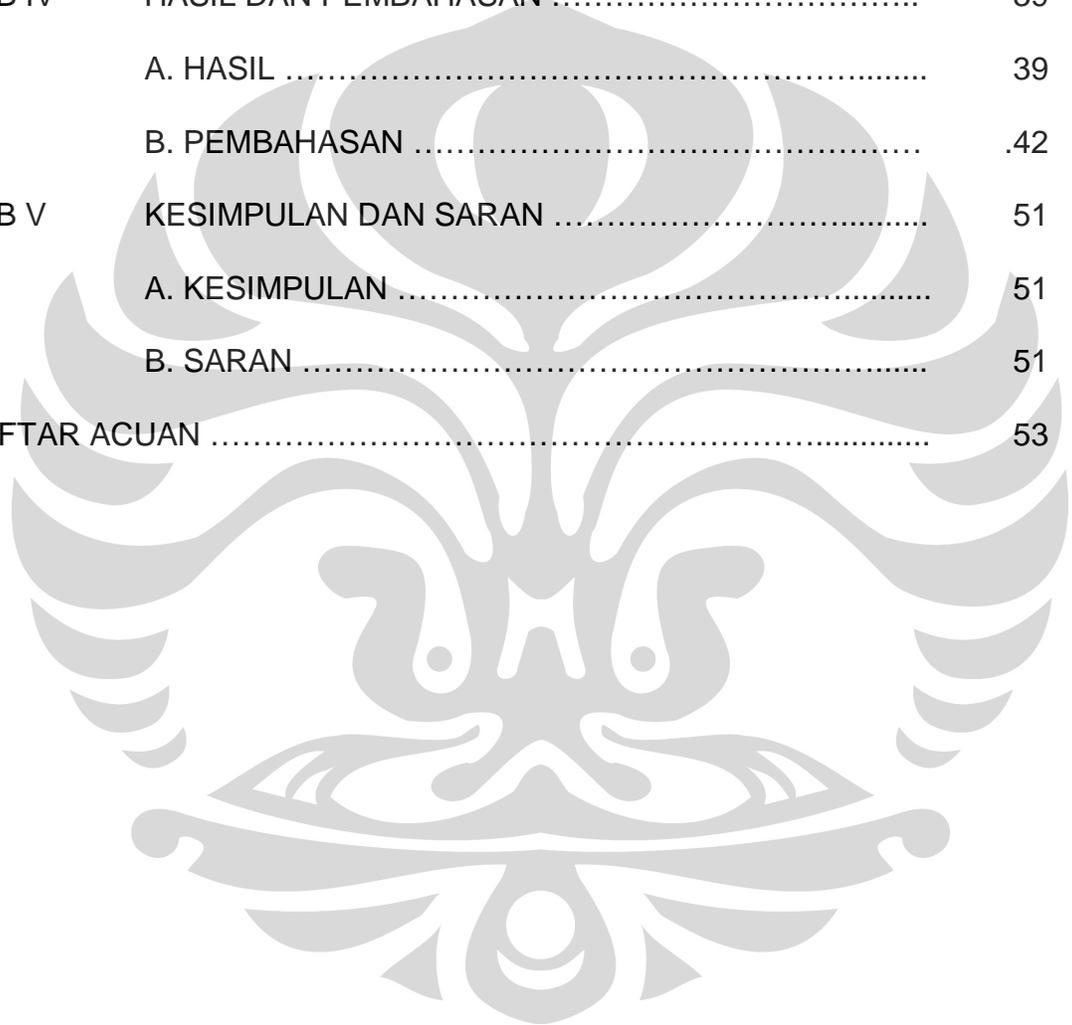
Bibliography : 32 (1986–2009)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. ETIL KARBAMAT	5
B. MINUMAN BERALKOHOL	8
C. KROMATOGRAFI GAS.....	13
D. VALIDASI METODE ANALISIS	23
E. METODE ANALISIS ETIL KARBAMAT	29

BAB III	METODOLOGI PENELITIAN	31
	A. ALAT	31
	B. BAHAN	31
	C. CARA KERJA	32
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	39
	A. HASIL	39
	B. PEMBAHASAN	42
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	51
	A. KESIMPULAN	51
	B. SARAN	51
DAFTAR ACUAN	53



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumus struktur etil karbamat.....	5
2. Alat kromatografi gas Shimadzu GC – 17A.....	59
3. Kromatogram standar etil karbamat 15010 µg/ml (waktu retensi etil karbamat 5,5 menit).....	60
4. Kurva hubungan suhu awal kolom dan HETP dari larutan standar etil karbamat 15010 µg/ml dengan laju alir gas 0,9 ml/menit (a); 0,6 ml/menit (b); dan 0,3 ml/menit (c).....	61
5. Kurva hubungan laju alir gas pembawa dan HETP dari larutan standar etil karbamat 15010 µg/ml dengan suhu awal kolom 210°C (a); 200°C (b); dan 180°C (c).....	62
6. Kurva kalibrasi standar etil karbamat.....	63
7. Kromatogram sampel minuman beralkohol A.....	64
8. Kromatogram sampel minuman beralkohol B.....	64
9. Kromatogram sampel minuman beralkohol C.....	65

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pemilihan kondisi analisis optimum untuk analisis etil karbamat dalam minuman beralkohol dengan variasi suhu kolom dan laju alir gas pembawa.....	69
2. Data kurva kalibrasi standar etil karbamat.....	70
3. Data linieritas etil karbamat.....	71
4. Data uji presisi etil karbamat.....	72
5. Data uji perolehan kembali etil karbamat sampel A.....	73
6. Data uji perolehan kembali etil karbamat sampel B.....	74
7. Data uji perolehan kembali etil karbamat sampel C.....	75
8. Data batas deteksi dan batas kuantitasi etil karbamat.....	76
9. Data penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol	77

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan regresi linier.....	81
2. Cara perhitungan uji presisi.....	82
3. Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	83
4. Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi, dan linieritas.....	85
5. Cara perhitungan kadar zat dalam sampel.....	86
6. Skema penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol.....	87
7. Sertifikat analisis standar etil karbamat.....	88

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Etil karbamat atau uretan ($\text{H}_2\text{NCOOC}_2\text{H}_5$) adalah senyawa ester etil dari asam karbamat (NH_2COOH) yang mengkontaminasi makanan dan minuman hasil fermentasi mulai dari kadar ng/l hingga mg/l (1). Etil karbamat mulai mendapatkan perhatian pada tahun 1985 setelah senyawa ini ditemukan pada minuman beralkohol jenis anggur dan *distilled spirit* mulai dari kadar 15 ppb hingga 12 ppm. Pada November 1986, FDA mulai membuat aturan untuk membatasi kontaminasi etil karbamat dalam berbagai macam minuman beralkohol (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada *table wine*; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada *fortified wine*; 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada *distilled spirit*; 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pada *fruit brandy* dan *liqueur*) (2).

Pembentukan etil karbamat dalam minuman beralkohol terjadi secara alamiah (3). Jalur yang paling umum yaitu melalui reaksi urea dengan etanol. Etil karbamat terbentuk melalui reaksi alifatik etanol dengan urea dengan adanya bermacam katalis. Urea terbentuk selama proses fermentasi berlangsung. Faktor yang mempengaruhi pembentukan urea dalam minuman beralkohol yaitu kandungan arginin, temperatur, dan lama penyimpanan (4,5).

Di Indonesia sendiri, belum ada peraturan mengenai batas kandungan etil karbamat dalam minuman beralkohol. Peraturan pemerintah baru dalam tahap pengawasan dan pengendalian minuman beralkohol dalam hal produksi, pengedaran, dan penjualan atau penyajian minuman beralkohol, khususnya minuman keras karena hal tersebut penting demi menyelenggarakan ketentraman dan ketertiban kehidupan masyarakat Indonesia (6).

Sering munculnya pemberitaan tentang tata-niaga minuman keras setidaknya merupakan indikasi bahwa minuman beralkohol banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Dahulu masyarakat Indonesia hanya mengkonsumsi minuman beralkohol di daerah perkebunan atau daerah dingin saja, namun kini mengkonsumsi minuman beralkohol sudah menjadi bagian dari gaya hidup (7).

Beberapa penyakit yang berhubungan dengan kebiasaan mengkonsumsi minuman beralkohol antara lain sirosis hati, kanker, penyakit jantung, dan syaraf. Sebuah penelitian memperkirakan bahwa konsumsi 210 gram alkohol –atau setara dengan mengkonsumsi sepertiga botol minuman beralkohol jenis *liqueur* setiap hari selama 25 tahun– akan "menghasilkan" sirosis hati (7).

Kontaminasi etil karbamat dalam minuman beralkohol juga dapat membahayakan tubuh. Batas konsumsi etil karbamat adalah 0,3 mg/kg BB per hari dengan rata-rata konsumsi etil karbamat dari makanan hasil

fermentasi hampir 15 ng/kg BB per hari (1). Etil karbamat bersifat genotoksik dan karsinogenik untuk sejumlah spesies, seperti tikus, mencit, hamster, dan monyet pada pemberian dosis tunggal 100-2000 mg/kg berat badan per oral selama empat minggu (8). *International Agency for Research on Cancer* (IARC) mengklasifikasikan etil karbamat ke dalam kelompok 2A (*probably carcinogenic to humans*) (9). Dilihat dari karsinogenisitasnya tersebut, perlu dilakukan analisis terhadap kontaminasi etil karbamat dalam minuman beralkohol untuk selanjutnya dilakukan pengawasan terhadap jumlah etil karbamat yang diperbolehkan ada dalam minuman beralkohol.

Terdapat beberapa cara untuk menganalisis etil karbamat dalam minuman beralkohol, antara lain dengan menggunakan kromatografi gas–spektrum massa, kromatografi gas–detektor ionisasi nyala, dan kromatografi cair kinerja tinggi–detektor fluoresensi (10, 11, 12, 13, 14). Metode yang akan digunakan pada penelitian ini adalah kromatografi gas. Metode ini merupakan metode yang paling sering digunakan di laboratorium penelitian dan industri. Hal ini disebabkan oleh tingkat keberhasilan yang tinggi, sensitivitas yang tinggi pada sistem detektor, efisiensi pemisahan yang baik, memiliki kepekaan yang tinggi sehingga jumlah sampel yang diperlukan untuk analisis relatif sedikit. Sampel yang dianalisis harus dapat menguap pada suhu analisis, penafsiran data yang diperoleh biasanya cepat, mudah dijalankan dan dipahami (15).

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan menetapkan kadar etil karbamat yang terkandung dalam tiga merek minuman beralkohol yang berbeda dengan kadar alkohol kurang dari 5%, 14,7%, dan 43%. Sampel minuman beralkohol dipilih karena kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol lebih besar dibandingkan dengan yang terkandung dalam makanan hasil fermentasi. Data WHO menyebutkan bahwa pemaparan etil karbamat dalam populasi manusia yang terbanyak adalah melalui konsumsi minuman beralkohol (16).

B. TUJUAN PENELITIAN

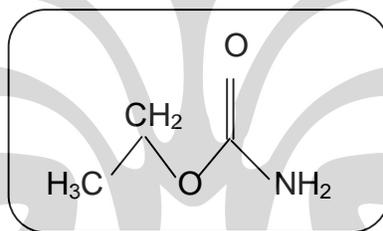
1. Memperoleh kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol secara kromatografi gas.
2. Memperoleh metode analisis yang valid untuk penetapan kadar etil karbamat dari kondisi analisis optimum yang diperoleh.
3. Menentukan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol dengan menggunakan metode analisis yang telah divalidasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. ETIL KARBAMAT

Etil karbamat (sinonim: uretan, etil uretan) merupakan kristal tidak berwarna, tidak berbau dan memiliki bobot molekul 89,09. Etil karbamat memiliki jarak lebur 48° – 50°C dan jarak didih 182° – 184°C . Kelarutan etil karbamat dalam g/ml pelarut adalah 0,5 (air); 0,8 (alkohol); 2,5 (gliserol); 0,9 (kloroform); 1,5 (eter). Rumus struktur etil karbamat adalah sebagai berikut (17,18) :



Gambar 1 : Rumus struktur etil karbamat

Larutan etil karbamat dalam air digunakan sebagai kosolven untuk pembuatan bahan-bahan organik, pestisida, dan fumigan (17,18). Dahulu etil karbamat digunakan sebagai agen antineoplastik dan tujuan pengobatan lainnya, seperti mengobati *myeloma*. Namun setelah diketahui bahwa etil karbamat bersifat toksik maka penggunaannya dalam pengobatan dihentikan (19).

Etil karbamat diabsorpsi dari saluran gastrointestinal dan kulit dengan cepat dan rata-rata terdistribusi ke seluruh tubuh. Eliminasi juga berlangsung

cepat dimana pada mencit lebih dari 90% tereliminasi menjadi karbondioksida dalam waktu enam jam (16). Metabolisme etil karbamat melalui tiga jalur penting, yaitu hidrolisis, N–hidroksilasi atau C–hidroksilasi dan oksidasi rantai samping. Jalur metabolisme utama yaitu melalui hidrolisis menjadi etanol dan ammonia dan oksidasi rantai samping menjadi vinil karbamat. Senyawa terakhir ini, lebih karsinogen daripada etil karbamat dimana etil karbamat diubah melalui reaksi epoksidasi menjadi vinil karbamat epoksida yang dapat terikat secara kovalen dengan DNA, RNA, dan protein sehingga menghasilkan pembentukan *adduct*. Selain itu, pengikatan tersebut dapat menginduksi substitusi pasangan basa pada DNA dari jaringan tumor (16,20).

International Agency for Research on Cancer (IARC) mengklasifikasikan etil karbamat ke dalam kelompok 2A (*probably carcinogenic to humans*) dan oleh *National Toxicology Program (NTP)* terdaftar sebagai “*reasonably anticipated to be a human carcinogen*” (9,19).

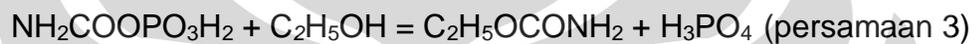
Etil karbamat telah banyak diteliti untuk memeriksa sifat genotoksisitas dan karsinogenisitasnya. Pada penelitian terhadap sel somatik secara *in vivo* menunjukkan adanya penyimpangan kromosom, pembentukan mikronukleus, dan *sister chromatid exchange*. Penelitian terhadap mencit jantan dan betina yang diberikan minuman yang mengandung etil karbamat dengan konsentrasi 9 mg/kg BB per hari selama empat minggu, menunjukkan adanya hubungan antara dosis dengan peningkatan terjadinya kanker alveolus,

bronkioli, dan hati serta kanker kelenjar mammae atau *adenocarcinoma* (hanya untuk mencit betina) (16).

Pembentukan etil karbamat dalam minuman beralkohol terjadi secara alamiah (5). Jalur yang paling umum yaitu melalui reaksi urea dengan etanol (persamaan 1) (4). Urea terbentuk selama berlangsungnya proses fermentasi. Ada enam asam amino yang berperan pada sintesis urea, yaitu asam amino N-asetilglutamat, ornitin, arginin, arginosuksinat, aspartat, dan sitrulin. N-asetilglutamat hanya bertindak sebagai zat pengaktif enzim sedangkan asam amino lainnya bertindak sebagai pembawa atom karbon. Asam amino merupakan nutrisi yang dibutuhkan oleh khamir yang digunakan selama proses fermentasi saat pembuatan minuman beralkohol. Jika jumlah urea yang disintesis berada dalam jumlah yang berlebih hingga melewati konsentrasi kritis maka khamir akan melepaskan urea ke luar sel dan akhirnya akan bereaksi dengan etanol hasil fermentasi yang terkandung dalam minuman beralkohol (1,21).

Mekanisme pembentukan etil karbamat yang lain adalah melalui prekursor etil karbamat, seperti asam sianat, isosianat, sitrulin, dan karbamil fosfat. Asam sianat dan isosianat merupakan hasil dekomposisi urea dalam suasana panas (22). Kedua prekursor tersebut dapat membentuk etil karbamat bila bereaksi dengan etanol dalam suasana asam (persamaan 2) (23,24). Dua prekursor yang lain, yaitu sitrulin dan karbamil fosfat dihasilkan selama fermentasi oleh khamir (25). Etanolisis dari prekursor tersebut akan

membentuk etil karbamat (persamaan 3) (26,27). Dengan demikian, pembentukan etil karbamat dalam minuman beralkohol merupakan proses yang melibatkan banyak faktor dimana selain bergantung pada jumlah prekursor juga bergantung pada temperatur, cahaya, dan lama penyimpanan (1)



B. MINUMAN BERALKOHOL

Minuman beralkohol adalah minuman yang diproses dari bahan hasil pertanian yang mengandung karbohidrat dengan cara fermentasi atau fermentasi yang dilanjutkan dengan penyulingan sesuai keperluan, baik dengan cara memberikan perlakuan terlebih dahulu atau tidak, menambahkan bahan lain atau tidak, maupun yang diproses dengan cara mencampur konsentrat dengan alkohol atau dengan cara pengenceran minuman beralkohol, sehingga produk akhirnya berbentuk cairan yang mengandung etanol (7).

Indikator terbaik untuk efek minuman beralkohol adalah kandungan alkohol dalam darah. Ketika kandungan alkohol darah mencapai 5% (5

bagian alkohol per 100 bagian cairan darah) maka akan timbul sensasi positif, seperti perasaan relaks dan euforia. Namun kandungan di atas 5%, akan timbul perasaan tidak enak dan secara bertahap akan kehilangan kendali bicara, keseimbangan, dan emosi. Jika kandungan alkohol dalam darah dinaikkan kembali hingga 0,1 % menyebabkan mabuk total. Kemudian pada tingkat 0,2% kesadaran akan hilang. Jika mencapai 0,3% sebagian orang akan mengalami koma, dan jika mencapai 0,4% kemungkinan besar akan menyebabkan kematian (7).

Minuman beralkohol dibuat dengan cara fermentasi khamir dari bahan baku yang mengandung pati atau gula tinggi. Kata fermentasi berasal dari bahasa latin "*fervere*" dan secara sempit diartikan sebagai transformasi sari buah anggur menjadi minuman anggur (*wine*). Saat ini fermentasi berarti disimilasi (katabolisme) anaerobik senyawa-senyawa organik yang disebabkan oleh aktivitas mikroba atau ekstrak dari sel-sel tersebut. Hal yang perlu diperhatikan selama fermentasi adalah pemilihan khamir, nutrien, konsentrasi gula, keasaman, pemberian oksigen, dan suhu dari perasan buah. Substrat yang baik untuk fermentasi adalah substrat yang mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan oleh sel khamir, seperti sumber karbon, nitrogen, vitamin, dan mineral dalam jumlah yang cukup (28).

Proses penambahan gula pada sari buah perlu diberikan perhatian karena penambahan yang dilakukan tersebut bertujuan untuk memperoleh konsentrasi alkohol yang lebih tinggi. Jika kadar gula yang ditambahkan

melebihi batas yang diperlukan maka aktivitas khamir dapat terhambat. Penambahan kadar gula akan mengarahkan fermentasi lebih sempurna, menjamin kestabilan minuman beralkohol yang dihasilkan, dan menghasilkan alkohol yang tinggi. Kadar gula yang optimum untuk aktivitas pertumbuhan khamir adalah 10 % (28).

Suhu memiliki peran yang penting dalam menentukan laju fermentasi, komposisi produk akhir, dan cita rasa dari minuman beralkohol yang dihasilkan. Makin rendah suhu fermentasi maka kadar alkohol yang dihasilkan semakin tinggi. Hal ini dikarenakan pada suhu rendah fermentasi akan lebih sempurna dan kehilangan alkohol karena terbawa oleh gas karbondioksida akan lebih sedikit (28).

Waktu yang dibutuhkan untuk melakukan proses fermentasi bergantung pada jenis khamir yang digunakan, kadar gula mula-mula, dan kadar alkohol yang ingin dicapai. Minuman beralkohol dengan jenis anggur merah umumnya memerlukan waktu 14-20 hari untuk proses fermentasi yang sempurna (28).

Penggolongan minuman beralkohol berdasarkan kandungan alkoholnya adalah sebagai berikut (7) :

- a. Golongan A adalah minuman beralkohol dengan kadar etanol 1–5%
- b. Golongan B adalah minuman beralkohol dengan kadar etanol 5–20%
- c. Golongan C adalah minuman beralkohol dengan kadar etanol 20–55%

Untuk minuman beralkohol dengan kadar etanol antara 2,5% hingga 55% adalah kelompok minuman beralkohol yang produksi, peredaran, dan penjualannya ditetapkan sebagai barang dalam pengawasan (7).

Berikut adalah macam-macam minuman beralkohol (29):

1. Anggur (*Wine*)

a. Anggur merah

Anggur merah adalah anggur yang dibuat dari anggur merah (red grape). Anggur ini mendapatkan warnanya dari proses ekstraksi warna yang terdapat dalam kulit anggur merah.

b. *Rosé Wine*

Rosé Wine adalah sebutan bagi *wine* yang berwarna merah jambu (*pink* atau *rosé*) dimana cara pembuatannya persis seperti anggur merah, namun proses ekstraksi warnanya lebih singkat.

c. Anggur Putih

Anggur Putih adalah anggur yang dibuat dari buah anggur hijau.

d. *Sparkling Wine*

Sparkling wine adalah *wine* yang memiliki banyak kandungan gas CO₂ berupa buih atau gelembung.

e. *Dessert Wine*

Dessert wine adalah *wine* yang terasa manis karena mengandung banyak *residual sugar* (gula yang tidak habis difermentasi menjadi alkohol).

f. *Fortified Wine*

Fortified wine adalah *wine* yang ditingkatkan kadar alkoholnya hingga mencapai 17–20%.

2. *Spirit*

Spirit adalah minuman beralkohol hasil proses penyulingan yang kadar alkoholnya lebih tinggi dibandingkan *wine*, contoh vodka, rum, *whisky*, tequila, *brandy*, dan arak.

3. *Liqueur*

Liqueur adalah *spirit* yang diberi tambahan perasa (*flavouring*) dan dalam kebanyakan kasus, pemanis, contoh Midori, Malibu, Baile's.

4. *Cocktail*

Cocktail adalah minuman beralkohol hasil racikan satu atau lebih minuman beralkohol yang juga bisa dicampur dengan es, sari buah, dan bahan-bahan lainnya.

5. *Fruit Wine*

Fruit wine adalah minuman beralkohol yang dibuat dari berbagai macam buah, seperti apel, ceri, stroberi, persik, *plum*. Kandungan alkohol *fruit wine* mirip dengan *wine*, yaitu 11–12%.

C. KROMATOGRAFI GAS

1. Teori Dasar

Kromatografi gas merupakan metode yang dinamis untuk pemisahan dan deteksi senyawa-senyawa organik yang mudah menguap dan senyawa-senyawa gas anorganik dalam suatu campuran. Kegunaan umum kromatografi gas adalah untuk melakukan pemisahan dinamis dan identifikasi semua jenis senyawa-senyawa organik yang mudah menguap dan juga untuk melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu campuran. Bila fase diam berupa zat padat disebut dengan kromatografi gas-padat (KGP). Bila fase diam berupa zat cair disebut dengan kromatografi gas-cair (KGC) (30,31).

Keuntungan kromatografi gas yaitu :

1. Kecepatan

Penggunaan gas sebagai fase gerak mempunyai keuntungan, yaitu cepat tercapainya kesetimbangan antara fase gerak dan fase diam, dan dapat digunakan gas pembawa dengan kecepatan tinggi (31).

2. Resolusi (daya pisah)

Resolusi adalah jarak antara kromatogram satu dengan kromatogram lain yang berdekatan. Resolusi merupakan salah satu parameter efisiensi

kolom dimana suatu metode analisis dikatakan memiliki efisiensi kolom yang baik bila nilai resolusi 1,5 atau lebih. Kromatografi gas merupakan teknik yang selektif dan sensitif sehingga dapat melakukan pemisahan dengan nilai resolusi yang baik (31).

3. Analisis kualitatif

Analisis kualitatif adalah cara untuk mengidentifikasi adanya suatu senyawa dalam sampel. Pada kromatografi gas, analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi senyawa yang dianalisis dengan waktu retensi standar. Waktu retensi adalah waktu sejak penyuntikan hingga mencapai puncak maksimum. Dengan menggunakan aliran yang tepat dan mengendalikan suhu, waktu retensi dapat terulang dalam batas 1% dan dapat digunakan untuk mengidentifikasi tiap puncak. Beberapa senyawa mungkin mempunyai waktu retensi yang sama atau berdekatan, tetapi tiap senyawa hanya mempunyai satu waktu retensi saja. Waktu retensi ini tidak terpengaruh oleh adanya komponen lain (31).

4. Analisis kuantitatif

Prinsip analisis kuantitatif suatu komponen zat dilakukan dengan perhitungan relatif dari tinggi atau area kromatogram sampel terhadap standar. Metode yang biasa digunakan untuk melakukan analisis kuantitatif adalah dengan menggunakan metode baku luar (*external standar*) atau baku dalam (*internal standar*) (15).

a. Metode Baku Luar

Kurva kalibrasi zat baku (standar) dibuat dengan cara membuat larutan baku dengan berbagai macam konsentrasi larutan sampel yang akan dianalisis, disuntikkan, dan diukur areanya. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot area sampel pada kurva kalibrasi atau dengan rumus perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan (32).

b. Metode Baku Dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan area kedua zat tersebut. Dibuat kurva perbandingan antara area terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot perbandingan area komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan metode ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminasi. Kekurangan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (32).

Persyaratan suatu senyawa dapat digunakan untuk baku dalam adalah (32) :

1. Terpisah dengan baik dari senyawa yang dituju atau puncak-puncak lain

2. Mempunyai waktu retensi yang hampir sama dengan analit
 3. Tidak terdapat pada sampel
 4. Memiliki kemiripan sifat-sifat dengan analit dalam tahapan-tahapan persiapan sampel
 5. Tidak memiliki kemiripan secara kimiawi dengan analit
 6. Tersedia dalam perdagangan dengan kemurnian yang tinggi
 7. Stabilitas dan tidak reaktif dengan sampel atau dengan fase gerak
 8. Memiliki respon detektor yang hampir sama dengan analit
5. Kepekaan

Kepekaan (sensitivitas) adalah kemampuan suatu metode untuk menganalisis suatu senyawa dalam jumlah yang kecil dengan adanya gangguan dari matriks yang dimiliki oleh sampel. Pada kromatografi gas, kepekaan bergantung pada detektor yang digunakan, sebagai contoh detektor hantar panas (TCD) dapat mendeteksi sampai 0,01% (100 bpj = bagian per juta), detektor ionisasi nyala (FID) dapat mendeteksi dengan mudah bagian per juta, detektor tangkap elektron (ECD) dan detektor nitrogen-fosfor (NPD) dapat mengukur pada skala pikogram (10^{-12} g). Keuntungan tambahan dari kepekaan yang tinggi ini adalah jumlah cuplikan yang diperlukan sedikit sekali. Beberapa mikroliter saja sudah cukup untuk melakukan analisis lengkap, mulai dari analisis kualitatif hingga analisis kuantitatif (15).

6. Kesederhanaan

Kromatografi gas mudah dijalankan dan mudah dipahami. Penafsiran data yang diperoleh biasanya cepat dan mudah (30).

2. Sistem Kromatografi

1. Fase gerak

Fase gerak pada kromatografi gas disebut juga dengan gas pembawa karena tujuan awal dari fase gerak adalah membawa zat yang dianalisis melewati kolom untuk selanjutnya berinteraksi dengan fase diam agar terjadi pemisahan. Syarat gas dapat digunakan sebagai fase gerak adalah (31):

- a. tidak reaktif
- b. murni/kering karena jika tidak murni akan berpengaruh pada detektor
- c. dapat disimpan dalam tangki tekanan tinggi (biasanya merah untuk hidrogen dan abu-abu untuk nitrogen).

Gas pembawa biasanya mengandung helium, nitrogen, hidrogen atau campuran argon dan metana. Pemilihan gas pembawa tergantung pada penggunaan spesifik dan jenis detektor yang digunakan. Helium merupakan tipe gas pembawa yang sering digunakan karena memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik (mengurangi pelebaran pita) (30).

2. Ruang suntik sampel pada kromatografi gas

Komponen kromatografi gas yang utama selanjutnya adalah ruang suntik atau *inlet*. Fungsi dari ruang suntik ini adalah untuk mengantarkan sampel ke dalam aliran gas pembawa. Penyuntikan sampel dapat dilakukan secara manual atau secara otomatis (yang dapat menyesuaikan jumlah sampel) (30).

3. Kolom

Kolom merupakan tempat dimana terjadinya proses pemisahan karena di dalamnya terdapat fase diam. Oleh karena itu, kolom merupakan komponen sentral pada kromatografi gas. Ada dua jenis kolom pada kromatografi gas, yaitu kolom kemas (*packing column*) dan kolom kapiler (*capillary column*) (31).

Kolom kemas terdiri dari fase cair (sekurang-kurangnya pada suhu kromatografi) yang tersebar pada permukaan penyangga yang lembam (*inert*) yang terdapat dalam tabung yang relatif besar (diameter dalam 1–3 mm). Sedangkan kolom kapiler memiliki diameter yang jauh lebih kecil (0,02–0,2 mm) dimana dinding kapiler bertindak sebagai penyangga lembam untuk fase diam cair (31).

4. Penyangga padat

Penyangga padat menyediakan permukaan lembam yang luas dan seragam. Beberapa sifat penyangga yang diperlukan adalah (30) :

- a. Lembam (mencegah penyerapan)
- b. Daya tahan remuknya tinggi (tidak mudah remuk)
- c. Permukaannya luas
- d. Bentuknya teratur, ukurannya seragam

5. Fase diam

Ciri-ciri fase diam yang ideal adalah sebagai berikut (30) :

- a. Cuplikan harus menunjukkan koefisien distribusi yang berbeda
- b. Cuplikan harus mempunyai kelarutan yang berarti dalam fase diam
- c. Fase diam harus mempunyai tekanan uap yang dapat diabaikan pada suhu kerja

6. Suhu

Kromatografi gas didasarkan pada sifat senyawa yang dipisahkan yakni kelarutan senyawa dalam cairan tertentu dan tekanan uapnya (titik didih senyawa). Karena tekanan uap berbanding langsung dengan suhu, maka suhu merupakan faktor yang utama pada kromatografi gas (31).

Pemisahan pada kromatografi gas dapat dilakukan pada suhu tetap yang biasanya disebut dengan pemisahan isothermal dan dapat dilakukan dengan menggunakan suhu yang berubah secara terkendali yang disebut dengan pemisahan suhu terprogram. Pemisahan isothermal paling baik dipakai pada analisis rutin atau jika kita mengetahui agak banyak sifat sampel

yang akan dipisahkan. Pemrograman suhu dilakukan dengan menaikkan suhu dari suhu tertentu ke suhu tertentu yang lain dengan laju yang diketahui dan terkendali dalam waktu tertentu (30).

7. Detektor

Detektor pada kromatografi adalah suatu sensor elektronik yang berfungsi mengubah sinyal-sinyal elektronik. Sinyal elektronik detektor akan sangat berguna untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap komponen-komponen yang terpisah di antara fase diam dan fase gerak (31).

Detektor yang sering digunakan pada kromatografi gas adalah sebagai berikut :

a. Detektor Hantar Panas (*Thermal Conductivity Detector = TCD*)

Detektor ini didasarkan pada penghantaran panas dari benda yang suhunya tinggi ke benda lain di sekelilingnya yang suhunya lebih rendah (31).

b. Detektor Konduktivitas Elektronik

Detektor ini merupakan detektor yang memiliki sensitivitas tinggi terhadap senyawa yang mengandung atom sulfur, nitrogen, dan golongan halogen (31).

c. Detektor Ionisasi Nyala (*Flame Ionization Detector = FID*)

Detektor ini didasarkan pada pengukuran jumlah atom karbon. Detektor jenis ini memiliki respon yang sangat peka, teliti, dan linier ditinjau dari segi ukuran cuplikan (31).

d. Detektor Tangkap Elektron (*Electron Capture Detector* = ECD)

Cara kerja detektor ini adalah melalui proses penangkapan sejumlah elektron yang dilakukan oleh senyawa yang mempunyai afinitas terhadap elektron bebas, yaitu senyawa yang mempunyai unsur-unsur elektronegatif (31).

e. Detektor Nitrogen–Fosfor (*Nitrogen Phosphorous Detector* = NPD)

Berdasarkan prinsip kerjanya, NPD memiliki kesamaan dengan FID, hanya saja fenomena mekanisme nyala plasma pada NPD masih belum jelas. Ada kemungkinan terjadi peristiwa pemadaman (*quenching*) dari nyala plasma dan logam alkali oleh nitrogen atau fosfor yang berasal dari sampel (31).

f. Detektor Fotometri Nyala (FPD)

Detektor ini didasarkan pada pembentukan spesies–spesies yang tereksitasi dari senyawa yang mengandung sulfur atau fosfor dimana spesies–spesies tersebut akan runtuh (*decay*) dan menghasilkan suatu emisi kemiluminesen (pendaran sinar) yang spesifik yang dapat diukur pada panjang gelombang tertentu (31).

g. Detektor Foto–Ionisasi

Detektor ini tanggap terhadap semua senyawa yang mempunyai potensial ionisasi pada kisaran potensial sumber lampu UV atau terhadap senyawa-senyawa yang mempunyai potensial ionisasi kurang dari 12 eV (31).

h. Detektor Spektrometer Massa

Spektrometer massa jika digunakan sebagai detektor maka akan mampu memberikan informasi mengenai struktur kimia senyawa yang belum diketahui. Dengan menggunakan spektrometer massa untuk memonitor ion tunggal atau beberapa ion yang karakteristik dalam analit maka batas deteksi ion-ion ini akan ditingkatkan (31).

8. Komputer

Kromatografi gas modern menggunakan komputer yang dilengkapi dengan perangkat lunaknya (*software*) untuk digitalisasi sinyal detektor dan mempunyai beberapa fungsi, antara lain (32):

- a. Memfasilitasi pengaturan parameter-parameter instrumen seperti: aliran fase gas, suhu oven dan pemrograman suhu, serta penyuntikan sampel secara otomatis
- b. Menampilkan kromatogram dan informasi-informasi lain dengan menggunakan grafik berwarna
- c. Merekam data kalibrasi, waktu retensi, serta perhitungan-perhitungan dengan statistik
- d. Menyimpan data parameter-parameter analisis yang diperlukan oleh senyawa tertentu

D. VALIDASI METODE ANALISIS

Validasi metode analisis adalah proses dimana suatu metode ditetapkan melalui serangkaian uji laboratorium bahwa karakter penampilan metode tersebut memenuhi persyaratan untuk penerapan metode yang dimaksud (15). Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduisibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Menurut USP, ada delapan langkah dalam melakukan validasi metode analisis, yaitu (31):

a. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan merupakan kedekatan metode analisis antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai sebenarnya atau nilai rujukan. Kecermatan diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel (31).

Ada tiga cara untuk menentukan akurasi, yaitu metode perbandingan terhadap standar acuan, metode simulasi (*spiked placebo recovery*) dan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*). Cara yang umum digunakan untuk menentukan kecermatan adalah berdasarkan persentase yang didapat dari kurva linier standar (15).

Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai perbandingan antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan rasio antara 98–102%. Pada

percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan plasebo harus disiapkan dengan kadar antara 50–150% dari kandungan yang diharapkan (15).

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi yang diperoleh}}{\text{konsentrasi yang sebenarnya}} \times 100\%$$

b. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Menurut *International Conference on Harmonization (ICH)*, keseksamaan dilakukan pada tiga tingkatan yang berbeda, yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*) (31).

1. Keterulangan yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
2. Presisi antara yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
3. Ketertiruan merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium yang lain.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel dengan matriks yang homogen (31).

c. Selektivitas

Selektivitas pada suatu metode adalah kemampuan metode tersebut dalam melakukan pengukuran terhadap analit tertentu saja dengan adanya gangguan dari komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel dimana hasil pengukuran tersebut memenuhi kriteria cermat dan seksama. Pada analisis yang dilakukan dengan metode kromatografi, selektivitas ditentukan melalui resolusinya (R_s). Resolusi adalah jarak antara kromatogram satu dengan kromatogram lain yang berdekatan. Pemisahan kromatogram yang baik diperoleh bila nilai resolusi 1,5 atau lebih (31).

d. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diperoleh dengan mengukur beberapa (minimal 5) konsentrasi standar yang berbeda antara 50–150% dari

kadar analit dalam sampel kemudian data diproses dengan menggunakan regresi linier sehingga dapat diperoleh nilai *slope*, intersep dan koefisien korelasi. Koefisien korelasi di atas 0,999 sangat diharapkan untuk suatu metode analisis yang baik (15,31).

Syarat kelinieran garis (15):

1. Koefisien korelasi (r) : $r \geq 0,9990$
2. Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0);
 $(r_i)^2$ sekecil mungkin ≈ 0

$$r_i = y_i - (b \times x_i + a)$$

3. Koefisien fungsi regresi (V_{x_0})

$$V_{x_0} \leq 2,0\% \text{ (sediaan farmasi)}$$

$$\leq 5,0\% \text{ (sediaan biologi)}$$

4. Kepekaan analisis ($\Delta y / \Delta x$)

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_2} = \frac{y_4 - y_3}{x_4 - x_3} = \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

- e. Rentang (*range*)

Rentang suatu metode didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linieritas yang mencukupi. Kisaran-kisaran konsentrasi yang diuji

tergantung pada jenis metode dan kegunaannya. Untuk pengujian komponen utama (mayor) maka konsentrasi baku harus diukur di dekat atau sama dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan. Suatu strategi yang baik adalah mengukur baku dengan rentang 25, 50, 75, 125, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (31).

f. Batas deteksi (LOD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respons sebesar respons blanko (y_b) ditambah dengan tiga simpangan baku blanko ($3S_b$) (31).

g. Batas kuantitasi (LOQ)

Batas kuantitasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). Perhitungan untuk mendapatkan LOQ didasarkan pada standar deviasi respons (SD) dan *slope* (S) kurva baku sesuai dengan rumus $LOQ = 10 (SD/S)$. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

Dengan cara ini, LOD dan LOQ sangat tergantung kepada nilai a (intersep) dari persamaan kurva kalibrasi yang menggambarkan galat sistematis. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) merupakan parameter yang tepat digunakan untuk membandingkan dua atau lebih metode penentuan kadar suatu analit atau membandingkan satu metode untuk beberapa macam analit (31).

h. Kekasaran (*ruggedness*)

Kekasaran merupakan tingkat reproduibilitas hasil yang diperoleh di bawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai persen standar deviasi relatif (%RSD). Kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium tempat dilakukan percobaan, metode analisis, alat, dan reagen yang digunakan, serta waktu melakukan percobaan yang berbeda (31).

Penentuan kekasaran pada suatu metode dapat dibatasi dengan kondisi-kondisi percobaan yang kritis, misalnya melakukan pengecekan terhadap pengaruh kolom kromatografi yang berbeda (pabrik dan jenisnya sama) atau pengaruh-pengaruh operasionalisasi metode pada laboratorium yang berbeda (31).

i. Ketahanan (*robustness*)

Ketahanan adalah kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter-parameter metode yang kecil, seperti persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, suhu, dan sebagainya (31).

E. METODE ANALISIS ETIL KARBAMAT

1. Kromatografi Gas–Flame Ionization Detector (FID), dengan baku dalam n-oktanol; HP 5790A *Gas Chromatograph*; kolom Chrompack CP Wax 57 CB yang digabungkan dengan kolom kapiler silika berukuran 16 m x 0,23 mm x 0,23 μ m. Gas pembawa yang digunakan adalah hidrogen dengan tekanan 0,7 bar; suhu oven diprogram dengan suhu awal isothermal 75°C ditahan selama 0,1 menit dengan kenaikan suhu 4,5°C/menit hingga 105°C, kemudian suhu dinaikkan kembali hingga 220°C dengan kenaikan suhu 30°C/menit dan suhu akhir isothermal adalah 220°C ditahan selama 5 menit. 1,0 μ l sampel diinjeksikan dengan suhu injektor 210°C dan suhu detektor 230°C (11).
2. Kromatografi Gas–Flame Ionization Detector (FID), dengan baku dalam n-heksan; HP-6890 *Gas Chromatograph*; kolom J & W, DB WAX berukuran 30 m x 0,53 mm x 1 μ m. Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan laju alir 6,0 ml/menit; suhu awal kolom adalah 90°C ditahan selama 1,0 menit dengan kenaikan suhu 5°C/menit hingga 150°C. Kemudian suhu dinaikkan kembali hingga 220°C dengan kenaikan suhu 30°C/menit. Suhu akhir adalah 220°C ditahan selama 2,67 menit. 1,0 ml sampel diinjeksikan dengan suhu injeksi 250°C dan temperatur detektor 300°C (12).
3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan detektor fluoresensi, baku dalam 9-xanthidrol; Hewlett Packard *Liquid Chromatograph*; kolom Hewlett

Packard AminoQuant 200 x 2,1 mm, partikel 5 mm dan pre-kolom Hewlett Packard ODS Hypersil 20 x 2,1 mm, partikel 5 mm. Fase gerak A adalah natrium asetat 20 mM pH 7,2; fase gerak B adalah asetonitril. Laju alir 0,45–0,6 ml/menit, dari menit ke-19 hingga menit ke-20 laju alir ditingkatkan menjadi 0,8 ml/menit. 15,0 µl sampel diinjeksikan dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 233 nm dan panjang gelombang emisi 600 nm (13).

4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-detektor fluoresensi, dengan kolom Spherisorb ODS-2 (C₁₈) 250 x 4 mm x 3 µm; baku dalam 9-xanthidrol. Fase gerak A dan B adalah metanol dan air. Laju alir menit ke-1 dan ke-22 adalah 0,95 ml/menit, laju alir menit ke-24 dan ke-31 adalah 1 ml/menit. Suhu oven 35°C dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 233 nm dan panjang gelombang emisi 600 nm (14).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. ALAT

1. Kromatografi gas Shimadzu GC-17A yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom kapiler J & W berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm , dengan fase diam VB-Wax
2. *Data processor Class GC solution*
3. *Microsyringe* berukuran 10 μl (Hamilton)
4. Pemanas (Cimarec)
5. Timbangan analitik (Acculab)
6. Pengaduk ultrasonik (Elmasonic)
7. Alat-alat gelas

B. BAHAN

1. Sampel minuman beralkohol dari tiga merek yang berbeda dengan kadar alkohol yang berbeda dan diambil dari sumber yang berbeda pula.

Sampel yang digunakan adalah sebagai berikut :

- a. Sampel A (dengan merek dagang BB)

Sampel A memiliki kadar alkohol kurang dari 5% dengan no. Batch 7389891140 diperoleh dari supermarket di daerah Jakarta Barat.

b. Sampel B (dengan merek dagang K)

Sampel B memiliki kadar alkohol 14,7% dengan no. Batch 899110240014 diperoleh dari toko jamu di daerah Depok Timur.

c. Sampel C (dengan merek dagang WH)

Sampel C memiliki kadar alkohol 43% dengan no. Batch 899315600110 diperoleh dari kafe di daerah Kemang.

2. Standar etil karbamat (Sigma)

3. Etanol p.a (Merck)

4. Gas Helium UHP

5. Gas Hidrogen HP

6. Gas Nitrogen HP

7. Gas Oksigen dari udara

C. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan induk etil karbamat

Standar etil karbamat ditimbang secara seksama dengan menggunakan timbangan analitik sebanyak 1,5010 g, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml dan dilarutkan dalam etanol hingga batas. Kemudian kocok hingga homogen. Hasil akhirnya diperoleh larutan induk etil karbamat 15010 µg/ml.

2. Pencarian kondisi analisis optimum

Kondisi analisis diadaptasi dari jurnal internasional dimana pada jurnal tersebut, etil karbamat dianalisis dengan metode pemrograman suhu, dengan suhu awal 75°C yang ditahan selama 0,1 menit dengan kenaikan suhu 4,5°C/menit hingga suhu 105°C. Kemudian suhu dinaikkan kembali hingga 220°C dengan kenaikan suhu 30°C/menit. Suhu akhir ditahan selama 5 menit. Suhu injektor dan detektor berturut-turut adalah 210°C dan 230°C (16).

Untuk memperoleh kondisi analisis optimum, disuntikkan 1,0 µl larutan standar etil karbamat dengan konsentrasi 15010 µg/ml ke dalam kolom. Paramater yang divariasikan adalah suhu kolom, yaitu 210°C; 200°C; 180°C; dan laju alir gas pembawa, yaitu 0,3; 0,6; dan 0,9 ml/menit . Pertama-tama elusi dilakukan dengan variasi laju alir gas pembawa masing-masing 0,3; 0,6; dan 0,9 ml/menit pada suhu kolom 210°C. Selanjutnya dilakukan variasi laju alir gas pembawa pada suhu kolom 200°C dan 180°C. Untuk semua elusi, suhu injektor dan detektor adalah 230°C.

Masing–masing kondisi dihitung nilai HETP dan dicatat waktu retensi, resolusi, dan jumlah lempeng teoritisnya. Kondisi terpilih adalah kondisi yang menunjukkan harga lempeng teoritis (N) yang tinggi, HETP yang kecil, waktu retensi yang relatif singkat, serta nilai resolusi 1,5 atau lebih.

3. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan induk etil karbamat diencerkan secara kuantitatif dengan etanol menggunakan pipet volum hingga didapatkan enam konsentrasi, yaitu 6004; 7505; 9006; 12008; 13509; 15010 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi 6004 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh dengan mengencerkan 4,0 ml larutan induk 15010 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam 10,0 ml etanol menggunakan pipet volum 4,0 ml. Konsentrasi 7505 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh dengan mengencerkan 5,0 ml larutan induk 15010 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam 10,0 ml etanol menggunakan pipet volum 5,0 ml. Konsentrasi 9006 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh dengan mengencerkan 6,0 ml larutan induk 15010 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam 10,0 ml etanol menggunakan pipet volum 6,0 ml. Konsentrasi 12008 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh dengan mengencerkan 8,0 ml larutan induk 15010 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam 10,0 ml etanol menggunakan pipet volum 8,0 ml. Konsentrasi 13509 $\mu\text{g/ml}$ diperoleh dengan mengencerkan 9,0 ml larutan induk 15010 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam 10,0 ml etanol menggunakan pipet volum 9,0 ml.

Masing–masing konsentrasi disuntikkan sebanyak 1,0 μl ke dalam kolom pada suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit, suhu injektor dan detektor 230°C. Area etil karbamat dicatat dan diolah secara statistik hingga diperoleh persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi dan koefisien korelasi (r).

4. Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi

Pengujian batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) dilakukan dengan melakukan perhitungan secara statistik menggunakan persamaan garis linier $y = 12,108x - 10865,667$. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis regresi linier tersebut, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) yaitu 2127,300 $\mu\text{g/ml}$.

5. Uji keterulangan (presisi)

Uji presisi etil karbamat dilakukan dengan pengukuran sedikitnya enam kali untuk tiap konsentrasi dan dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda (rendah, sedang, tinggi), yaitu 6004; 9006; dan 15010 $\mu\text{g/ml}$. Dari tiap konsentrasi disuntikkan sebanyak 1,0 μl ke dalam kolom pada suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit, suhu injektor dan detektor 230°C. Area etil karbamat dicatat dan dihitung nilai koefisien variasinya. Konsentrasi larutan standar etil karbamat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = 12,108x - 10865,667$. Metode yang digunakan memiliki keterulangan yang baik jika metode tersebut memberikan koefisien variasi (KV) 2% atau kurang.

6. Uji perolehan kembali (akurasi)

Metode yang digunakan adalah metode penambahan bahan baku atau *standard addition method* ke dalam sampel minuman beralkohol. Sampel A

dipipet sebanyak 5,0 ml menggunakan pipet volume 5,0 ml dan dimasukkan ke vial ukuran 10,0 ml. Kemudian ditambahkan standar etil karbamat sebanyak 1,0 ml dengan konsentrasi 6980 ppm. Sampel dipekatkan dengan menggunakan pemanas merek Cimarec pada suhu 150°C hingga kering yang ditandai dengan menguapnya seluruh pelarut. Pemekatan sampel menjadi jumlah yang lebih kecil dilakukan untuk menguapkan etanol yang terkandung dalam sampel. Selain itu, pemekatan tersebut diharapkan dapat meningkatkan kadar etil karbamat dalam sampel. Selanjutnya, sampel yang mengering tersebut dilarutkan dalam etanol sebanyak 1,0 ml. Etanol ditambahkan untuk melarutkan sampel yang mengering pada dasar vial. Pemilihan etanol sebagai pelarut karena etil karbamat sangat mudah larut dalam etanol. Selanjutnya sampel disonifikasi selama 2 x 30 menit hingga homogen yang ditandai dengan melarutnya seluruh sampel yang menempel pada dasar vial. Sampel disuntikkan sebanyak 1,0 µl ke dalam kolom pada suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit, suhu injektor dan detektor 230°C kemudian dicatat areanya.

Perlakuan yang sama dilakukan terhadap sampel A dengan penambahan standar etil karbamat dengan konsentrasi 8650 ppm dan 10380 ppm. Hal tersebut dilakukan pula pada sampel B dengan penambahan standar etil karbamat dengan konsentrasi 5850, 6720, dan 8770 ppm; dan pada sampel C dengan penambahan standar etil karbamat dengan konsentrasi yang sama seperti pada sampel A, yaitu 6980, 8650, dan 10380

ppm; serta dilakukan pula pada sampel tanpa penambahan standar etil karbamat. Prosedur diulangi sebanyak tiga kali. Kadar dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = 12,108x - 10865,667$ dan dihitung persentase perolehan kembalinya. Metode yang digunakan memiliki ketepatan yang baik jika metode tersebut memberikan nilai persentase perolehan kembali pada rentang 98–102%.

7. Penetapan kadar etil karbamat dalam sampel minuman beralkohol

Masing-masing sampel dipipet sebanyak 5,0 ml menggunakan pipet volume 5,0 ml dan dimasukkan ke vial ukuran 10,0 ml, dipekatkan dengan menggunakan pemanas merek Cimarec pada suhu 150°C hingga kering yang ditandai dengan menguapnya seluruh pelarut. Selanjutnya, sampel yang mengering tersebut dilarutkan dalam etanol sebanyak 1,0 ml. Selanjutnya sampel disonifikasi selama 2 x 30 menit hingga homogen yang ditandai dengan melarutnya seluruh sampel yang menempel pada dasar vial hingga homogen. Sampel disuntikkan sebanyak 1,0 µl ke dalam kolom pada suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit, suhu injektor dan detektor 230°C kemudian dicatat areanya.

a. Analisis Kualitatif

Area etil karbamat yang terdapat pada kromatogram sampel dicatat waktu retensinya dan dibandingkan dengan waktu retensi standar etil karbamat.

b. Analisis Kuantitatif

Area etil karbamat yang terdapat pada kromatogram sampel dicatat dan dihitung kadarnya dengan menggunakan persamaan regresi linier

$$y = 12,108x - 10865,667.$$



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

1. Pembuatan larutan induk etil karbamat

Larutan induk etil karbamat yang diperoleh memiliki konsentrasi 15010 $\mu\text{g/ml}$. Larutan induk ini digunakan untuk pengenceran agar didapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu yang lebih rendah. Larutan hasil pengenceran tersebut digunakan untuk membuat kurva kalibrasi.

2. Pencarian kondisi analisis optimum

Kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol adalah elusi pada suhu isothermal dengan suhu kolom 200°C . Laju alir gas yang digunakan untuk menghasilkan kondisi analisis optimum adalah 0,6 ml/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C . Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1, Gambar 5 dan 6.

3. Pembuatan kurva kalibrasi

Enam konsentrasi yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi adalah 6004, 7505, 9006, 12008, 13509, dan 15010 $\mu\text{g/ml}$. Persamaan

regresi linier dari kurva kalibrasi etil karbamat adalah $y = 12,108x - 10865,667$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9990. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 7.

4. Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi

Berdasarkan perhitungan statistik menggunakan persamaan garis regresi linier $y = 12,108x - 10865,667$, diperoleh batas deteksi (LOD) sebesar 0,527 mg/ml dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 2,005 mg/ml. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

5. Uji keterulangan (presisi)

Larutan standar etil karbamat dengan konsentrasi berbeda (rendah, sedang, tinggi) yaitu 6004; 9006; 15010 $\mu\text{g/ml}$ digunakan untuk uji presisi. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai koefisien variasi (KV) berturut-turut 0,99%; 1,41%; dan 0,88%. Data dapat dilihat pada Tabel 4.

6. Uji perolehan kembali (akurasi)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode adisi. Diperiksa kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol blanko dan minuman beralkohol dengan penambahan standar etil karbamat. Persentase uji perolehan kembali etil karbamat pada sampel A yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 6980 ppm sebesar $(101,61 \pm 0,22)\%$; yang ditambahkan standar

etil karbamat dengan konsentrasi 8650 ppm sebesar $(101,00 \pm 0,18)\%$; dan yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 10380 ppm sebesar $(101,42 \pm 0,28)\%$, sampel B yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 5850 ppm sebesar $(99,49 \pm 0,50)\%$; yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 6720 ppm sebesar $(99,95 \pm 0,61)\%$; dan yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 8770 ppm sebesar $(99,88 \pm 0,42)\%$, sampel C yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 6980 ppm sebesar $(101,05 \pm 0,63)\%$; yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 8650 ppm sebesar $(99,71 \pm 1,36)\%$; dan yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 10380 ppm sebesar $(100,28 \pm 0,92)\%$. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

7. Penetapan kadar etil karbamat dalam sampel minuman beralkohol

Dari ketiga sampel minuman beralkohol yang dianalisis, didapatkan bahwa etil karbamat tidak terdeteksi pada sampel dengan kandungan etanol kurang dari 5% (sampel A). Sedangkan pada sampel dengan kandungan etanol 14,7% (sampel B) dan 43% (sampel C) etil karbamat terdeteksi dengan kadar berturut-turut sebesar $(7,06 \pm 0,169)$ mg/ml dan $(9,38 \pm 0,081)$ mg/ml. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 7, Gambar 8, 9, dan 10.

B. PEMBAHASAN

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya etil karbamat dalam minuman beralkohol dan mengetahui kadar etil karbamat yang terkandung dalam sampel tersebut. Sampel yang digunakan adalah minuman beralkohol dari tiga merek yang berbeda. Konsentrasi alkohol yang terkandung dalam sampel dipilih mulai dari konsentrasi rendah, sedang hingga tinggi. Pemilihan merek sampel yang digunakan adalah merek yang banyak dikonsumsi oleh para peminum mulai dari usia remaja hingga dewasa. Informasi tersebut adalah hasil wawancara peneliti dengan peminum dan bartender yang bekerja di kafe di daerah Kemang, Jakarta Selatan. Lokasi pembelian sampel dipilih secara acak.

Pada penelitian ini digunakan Kromatografi gas Shimadzu GC-17A yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (FID), kolom kapiler VB-Wax 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm , gas pembawa helium. Pemilihan metode dengan kromatografi gas adalah berdasarkan kegunaan kromatografi gas yang baik untuk pemisahan dan identifikasi semua jenis senyawa-senyawa organik yang mudah menguap. Etil karbamat termasuk senyawa yang mudah menguap dilihat dari jarak didihnya, yaitu 182-184°C. Selain itu kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu campuran sehingga dapat digunakan untuk identifikasi dan penetapan kadar (31).

Detektor ionisasi nyala (Flame Ionization Detector = FID) dipilih sebagai detektor karena dapat mendeteksi hampir semua senyawa organik. Di samping itu, FID memiliki respons yang sangat peka dan teliti. Pemilihan penggunaan kolom kapiler adalah untuk mendapatkan efisiensi pemisahan kolom yang baik. Kolom kapiler memiliki diameter dalam pada rentang 0,10–0,53 mm. Semakin sempit diameter kolom, maka efisiensi pemisahan kolom semakin besar atau puncak kromatogram yang dihasilkan semakin tajam. Fase diam yang digunakan adalah VB-Wax yang bersifat polar sehingga memiliki kelarutan yang berarti untuk etil karbamat yang juga bersifat polar. Pemilihan gas pembawa disesuaikan dengan jenis detektor yang digunakan. Untuk detektor FID, gas pembawa yang dapat digunakan adalah helium, nitrogen, dan hidrogen (31).

Salah satu perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya adalah metode elusinya. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode isothermal sedangkan pada metode yang sudah pernah dilakukan menggunakan metode pemrograman suhu. Metode isothermal sering digunakan untuk analisis rutin karena aplikasinya lebih sederhana dan memiliki waktu analisis yang lebih singkat dibandingkan dengan metode pemrograman suhu. Selain itu, metode isothermal baik digunakan bila diketahui banyak informasi mengenai sifat-sifat zat yang akan dianalisis (31).

Perbedaan lainnya adalah tidak digunakannya baku dalam pada penelitian ini. Penelitian sebelumnya menggunakan baku dalam sedangkan

pada penelitian ini tidak digunakan baku dalam. Hal ini dikarenakan tahap preparasi sampel pada penelitian ini cukup sederhana, yaitu hanya pemekatan sampel untuk meningkatkan konsentrasi zat yang dianalisis. Sedangkan pada penelitian sebelumnya sampel diekstraksi dengan metode ekstraksi bertingkat. Tahap preparasi sampel yang sederhana menyebabkan kemungkinan timbulnya galat (kesalahan) saat preparasi sampel dapat diperkecil (31). Selain itu tahap preparasi sampel yang sederhana dapat menghemat waktu, tenaga, dan dapat diaplikasikan pada sampel dalam jumlah banyak. Tidak digunakannya baku dalam pada penelitian ini juga menghemat biaya analisis.

1. Pencarian kondisi analisis optimum

Kondisi analisis yang diadaptasi dari jurnal dioptimasi kembali karena kolom yang digunakan berbeda. Perbedaan kolom akan mengakibatkan kondisi analisis berubah. Oleh karena itu dilakukan pencarian kondisi analisis optimum untuk mendapatkan kondisi analisis yang memiliki ketepatan dan ketelitian yang baik untuk identifikasi dan penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol yang sesuai dengan kolom yang digunakan (31).

Parameter yang divariasikan pada proses optimasi ini adalah suhu kolom dan laju alir gas. Variasi suhu kolom yaitu 210°C, 200°C, dan 180°C. Pertimbangan variasi suhu kolom tersebut disesuaikan dengan fase diam yang digunakan. Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah VB–Wax yang memiliki suhu minimum 10°–30°C dan suhu maksimum 225°C.

Jika suhu kolom di bawah suhu minimum maka fase diam yang digunakan akan menjadi padat sedangkan jika suhu terlalu tinggi maka fase diam akan terurai secara perlahan-lahan. Selain itu, pertimbangan suhu kolom juga dilihat dari titik didih senyawa yang akan dianalisis. Jika suhu kolom di bawah titik didih senyawa yang akan dianalisis, maka senyawa tersebut tidak akan terelusi (31).

Variasi laju alir gas pembawa, yaitu 0,9 ml/menit, 0,6 ml/menit, dan 0,3 ml/menit. Pertimbangan variasi laju alir gas pembawa adalah diameter kolom yang digunakan. Penelitian ini menggunakan kolom kapiler yang memiliki diameter kecil sehingga laju alir yang digunakan memiliki rentang antara 0,2–2 ml/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C. Pertimbangan penetapan suhu injektor adalah suhu injektor harus diatur lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum. Jadi seluruh sampel akan menguap segera setelah sampel disuntikkan sedangkan pertimbangan suhu detektor adalah biasanya suhu detektor 15°–30°C lebih tinggi dari titik didih senyawa yang dianalisis. Selain itu, suhu detektor disesuaikan dengan detektor yang digunakan. Untuk detektor ionisasi nyala, suhu detektor harus di atas 100°C. Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya kondensasi uap air sehingga mengakibatkan pengkaratan pada detektor ionisasi nyala atau penghilangan (penurunan) sensitivitasnya (31).

Pada percobaan variasi suhu kolom dapat terlihat bahwa semakin tinggi suhu kolom maka waktu retensi etil karbamat akan semakin cepat. Hal

itu dapat dibuktikan dengan semakin cepat etil karbamat keluar pada kromatogram. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan pada tekanan tetap, laju alir gas meningkat dengan meningkatnya suhu. Semakin tinggi suhu kolom maka komponen sampel akan lebih cepat menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga waktu kontak sampel dengan fase diam menjadi lebih singkat. Dengan demikian pemisahan yang terjadi menjadi kurang baik (32).

Semakin rendah laju alir gas pembawa, maka resolusi senyawa etil karbamat mengalami peningkatan. Hal ini sesuai dengan teori bahwa semakin rendah laju alir gas pembawa, maka waktu sampel berada di dalam fase diam menjadi lebih lama karena komponen sampel lebih lambat didorong melalui kolom. Oleh karena itu, pemisahan yang terjadi semakin baik (32).

Parameter yang digunakan untuk memilih kondisi analisis optimum adalah jumlah pelat teoritis (N), tinggi setara pelat teoritis (*High Equivalent Theoretical* / HETP), resolusi (R_s), dan waktu retensi (t_R). Parameter tersebut merupakan parameter untuk efisiensi kolom dimana bila suatu metode memiliki nilai efisiensi kolom yang tinggi maka pemisahan yang terjadi juga akan baik. Suatu metode memiliki efisiensi kolom yang baik bila nilai N tinggi, HETP kecil, resolusi 1,5 atau lebih, dan waktu retensi yang singkat (31).

Dari hasil percobaan dengan menggunakan variasi suhu kolom dan laju alir gas pembawa didapatkan bahwa kondisi yang memberikan nilai N

paling tinggi, nilai HETP paling rendah, waktu retensi yang relatif singkat, dan nilai resolusi tinggi (1,5 atau lebih) adalah metode elusi suhu isothermal dengan suhu kolom 200°C dan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit. Suhu detektor dan injektor diatur pada suhu 230°C. Waktu retensi etil karbamat pada kondisi analisis ini adalah pada menit ke 5,5.

2. Pembuatan kurva kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi bertujuan untuk kepentingan analisis secara kuantitatif, yaitu untuk menghitung kadar zat yang terkandung dalam sampel. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan area yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi analit berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat dipertimbangkan dengan matang agar hasil pengukuran area sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut sehingga hasil pengukuran yang diperoleh lebih akurat (31).

Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai sumbu x, sedangkan area etil karbamat yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai sumbu y. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi etil karbamat yang diperoleh adalah $y = 12,108x - 10865,667$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,9990. Harga koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan area kromatogram yang dihasilkan sehingga kadar zat yang dianalisis dapat

dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier yang telah diperoleh (31).

3. Pengujian batas deteksi dan batas kuantitasi

Penentuan batas deteksi dan kuantitasi dalam suatu metode sangat penting karena batas deteksi dan kuantitasi merupakan parameter sensitivitas suatu metode. Semakin kecil nilai batas deteksi dan kuantitasi berarti metode yang digunakan semakin sensitif (31). Batas deteksi dan kuantitasi etil karbamat untuk metode analisis yang digunakan berturut-turut adalah 0,527 mg/ml dan 2,005 mg/ml. Konsentrasi tersebut berada di bawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup sensitif untuk menganalisis etil karbamat dalam minuman beralkohol yang memiliki matriks cukup kompleks.

4. Uji keterulangan (presisi)

Tujuan dilakukan uji keterulangan adalah untuk mengetahui apakah metode yang digunakan dapat menentukan kadar zat yang dianalisis dengan tepat. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai koefisien variasi (KV) 2% atau kurang (31).

Pada penelitian ini, hasil uji presisi memperlihatkan bahwa semua nilai koefisien variasi di bawah 2%. Hal tersebut menandakan bahwa hasil pengukuran yang satu dengan yang lain memiliki selisih yang sangat kecil sehingga metode ini memenuhi kriteria seksama.

5. Uji perolehan kembali (akurasi)

Pada penelitian ini dilakukan uji perolehan kembali dengan metode adisi. Pemilihan metode adisi dibandingkan dengan metode simulasi karena metode ini umum digunakan untuk menentukan persen perolehan kembali. Selain itu, perbedaan matriks pada tiap-tiap sampel menyebabkan metode adisi lebih sederhana diaplikasikan pada analisis kali ini dibandingkan dengan metode simulasi. Pada metode adisi, sejumlah standar etil karbamat ditambahkan ke sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan kondisi analisis terpilih. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen standar etil karbamat yang ditambahkan tadi dapat ditemukan (31,32).

Persentase uji perolehan kembali etil karbamat pada sampel A untuk konsentrasi 6980 ppm sebesar $(101,61 \pm 0,22)\%$; untuk konsentrasi 8650 ppm sebesar $(101,00 \pm 0,18)\%$; dan untuk 10380 ppm sebesar $(101,42 \pm 0,28)\%$, sampel B untuk konsentrasi 5850 ppm sebesar $(99,49 \pm 0,50)\%$; untuk konsentrasi 6720 ppm sebesar $(99,95 \pm 0,61)\%$; dan untuk konsentrasi 8770 ppm sebesar $(99,88 \pm 0,42)\%$, sampel C untuk konsentrasi 6980 ppm sebesar $(101,05 \pm 0,63)\%$; untuk konsentrasi 8650 ppm sebesar $(99,71 \pm 1,36)\%$; dan untuk 10380 ppm sebesar $(100,28 \pm 0,92)\%$. Dengan demikian maka hasil UPK etil karbamat memenuhi kriteria cermat karena memiliki nilai persentase perolehan kembali pada rentang 98-102%. Metode yang cermat berarti bahwa nilai rata-rata hasil pengukuran sangat dekat dengan nilai sebenarnya (31).

6. Penetapan kadar etil karbamat dalam sampel minuman beralkohol

Penetapan kadar etil karbamat dilakukan dengan memplot area etil karbamat ke persamaan regresi linier $y = 12,108x - 10865,667$. Dari ketiga sampel minuman beralkohol yang dianalisis, didapatkan bahwa etil karbamat tidak terdeteksi pada sampel dengan kandungan etanol kurang dari 5% (sampel A). Sedangkan pada sampel dengan kandungan etanol 14,7% (sampel B) dan 43% (sampel C) etil karbamat terdeteksi dengan kadar yang bervariasi, tergantung pada persentase kandungan etanol dari tiap-tiap sampel. Kadar etil karbamat dalam sampel B sebesar $(7,06 \pm 0,169)$ mg/ml dan sampel C sebesar $(9,38 \pm 0,081)$ mg/ml.

Sampel C memiliki kadar etil karbamat lebih besar daripada sampel B karena sampel C memiliki kandungan etanol yang lebih besar dibandingkan dengan sampel B. Kandungan etanol dalam sampel memiliki korelasi dengan kadar etil karbamat yang terbentuk. Hal ini dikarenakan jalur pembentukan etil karbamat yang paling umum adalah melalui reaksi urea dengan etanol sehingga semakin besar kandungan etanol dalam minuman beralkohol maka semakin besar pula kemungkinan etil karbamat dapat terbentuk. Pada penelitian ini, etil karbamat tidak terdeteksi pada sampel A. Tidak terdeteksinya etil karbamat pada sampel A belum tentu menyatakan bahwa etil karbamat tidak terdapat pada sampel A. Namun ada kemungkinan kadar etil karbamat pada sampel A berada di bawah batas deteksi metode yang digunakan pada penelitian ini sehingga etil karbamat tidak dapat terdeteksi.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi analisis optimum untuk analisis etil karbamat dalam minuman beralkohol dengan menggunakan GC-FID yang dilengkapi dengan kolom kapiler VB-Wax adalah elusi dengan suhu isothermal pada suhu kolom 200°C, laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit, suhu injektor dan detektor 230°C. Waktu retensi etil karbamat pada kondisi analisis optimum adalah 5,5 menit.
2. Metode analisis untuk penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol memenuhi kriteria validasi yang ditetapkan.
3. Hasil analisis dari ketiga sampel menunjukkan bahwa etil karbamat tidak terdeteksi pada sampel dengan kandungan etanol kurang dari 5% (sampel A). Sedangkan pada sampel dengan kandungan etanol 14,7% (sampel B) dan 43% (sampel C) etil karbamat terdeteksi dengan kadar berturut-turut sebesar $(7,06 \pm 0,169)$ mg/ml dan $(9,38 \pm 0,081)$ mg/ml.

B. SARAN

1. Agar mendapatkan nilai batas deteksi yang lebih sensitif perlu dicari metode dengan sensitivitas lebih besar, misalnya dengan menggunakan detektor yang berbeda, misalnya dengan NPD.

2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai etil karbamat dalam minuman tradisional Indonesia yang mengandung alkohol, misalnya minuman tuak dari Medan.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai pengaruh beberapa parameter spesifik, seperti temperatur dan lama penyimpanan terhadap kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol.



DAFTAR ACUAN

1. Weber JV & Sharypov VI. Ethyl Carbamate in Foods and Beverages: a Review. *Environl Chem Lett* (7), 2008: 233-247.
2. Segal M. *Too Many Drinks Spiked with Urethane*. U.S. Food and Drug Administration. 1988. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0488ur.html>. (28 April 2009).
3. Foulke JE. *Urethane in Alcoholic Beverage Under Investigation*. U.S. Food and Drug Administration. 1993. <http://www.cfsan.fda.gov/~frf/fc0293ur.html>. (28 April 2009)
4. Delledonne D, Rivetti F & Romano U. Developments in The Production and Application of Dimethylcarbonate. *Applied Catalysis A: General*, 2001: **221**(1-2):241-251.
5. Wang D, Yang B, Zhai X & Zhou L. Synthesis of Diethylcarbonate by Catalytic Alcoholysis of Urea. *Fuel Process Technol*, 2007: **88**(8):807-812.
6. Anonim. *Keppres No 3/1997 Pengawasan dan Pengendalian Minuman Beralkohol*. 2007: <http://zfikri.wordpress.com/2007/06/02/keppres-no-31997-pengawasan-dan-pengendalian-minuman-beralkohol/>. (2 Juni 2009).
7. Widianarko B, Pratiwi AR & Retnaningsih CH. *Teknologi, Produk, Nutrisi dan Keamanan Pangan. Seri Iptek Pangan, volume 1*. http://www.warintek.ristek.go.id/pangan_kesehatan/pangan/tips/TEK26.PDF. (25 Agustus 2009).
8. Beland FA, Benson WR, Mellick PW, Kovatch RM, Roberts DW, Fang JL & Doerge DR. Effect of Ethanol on The Tumoriginity of Urethane (ethyl carbamate) in B6C3F1 Mice. *Food Chem technol*, 2005: (43):1-19.

9. Anonim. *Consumption of Alcoholic Beverages and Ethyl Carbamate (Urethane)*. IARC Monograph, vol. 96. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/96-ethylcarbamate.pdf>. (8 Mei 2009).
10. Hesford F & Schneider K. Validation of a Simple Method for the Determination of Ethyl Carbamate in Stone Fruit Brandies by GC-MS. *Mitt Lebensm Hyg*, 2001: (92):250-259.
11. Andrey D. A Simple Gas Chromatography Method for Determination of Ethyl Carbamate in Spirits. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1986: (185): 21-23.
12. Anonim. *Determination of Ethyl Carbamate (IN-08387) in Hexazinone Technical Headspace Gas Chromatographic (GC) Trace Level Method*. 2005. http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/specs/docs/pdf/new/d+e/m_hexazinone.pdf. (8 Agustus 2009).
13. Herbert P, Santos L, Barros P & Alves A. A New HPLC Method to Determine Ethyl Carbamate in Alcoholic Beverages Using Fluorescence Detection. *J Food Sci*, 2002: (67):1616-1620.
14. Madrera RR & Valles BS. Determination of Ethyl Carbamate in Cider Spirits by HPLC-FLD. *Food Control*, 2009: (20):130-143.
15. Harmita. *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI, 2006: 157-168.
16. Anonim. *Evaluation of Certain Food Contaminants Sixty-fourth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. 2006. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_930_eng.pdf. (8 Mei 2009)
17. Anonim. *Merck Index, 14th ed vol.III*. USA: Merck & Co, 2006: 9874.

18. Anonim. *Clarke's Isolation and Identification of Drug*, 7th ed. London: The Pharmaceutical Press, 1986: 1059.
19. Anonim. *Eleventh Report on Carcinogens, Urethane*. NTP National Toxicology Program, NIEHS, National Institutes of Health. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s184uret.pdf>, (18 Agustus 2009).
20. Park KK, Liem A, Stewart BC & Miller JA. Vinyl Carbamate Epoxide, a Major Strong Electrophilic, Mutagenic, and Carcinogenic Metabolite of Vinyl Carbamate and Ethyl Carbamate (urethane). *Carcinogenesis*, 1993: (14):441–450.
21. Murray RK, Grannel DK, Mayes PA & Rodwell VW. *Biokimia Harper edisi 27*. Jakarta: Penerbit Buku kedokteran, 2001: 256-259.
22. Schaber PM, Colson J, Higgins S, Thielen D, Anspach B & Brauer J. Thermal Decomposition (Pyrolysis) of Urea in Open Reaction Vessel. *Thermochim Acta*, 2004: (424):131–142.
23. Riffikin HL, Wilson R, Howie D & Müller S. Ethyl Carbamate Formation in The Production of Pot Still Whisky. *J Inst Brew*, 1989: (95):115–119.
24. Bruno SNF, Vaitsman DS, Kunigami CN & Brasil MG. Influence of The Distillation Processes from Rio de Janeiro in The Ethyl Carbamate Formation in Brazilian Sugar Cane Spirits. *Food Chem*, 2007: **104**(4):1345–1352.
25. Aresta M, Boscolo M & Franco DW. Copper (II) Catalysis in Cyanate Conversion into Ethyl Carbamate in Spirits, and Relevant Reactions. *J Agric Food Chem*, 2001: **49**(6):2819–2824.
26. Butzke CE & Bisson LF. *Ethyl Carbamate Preventative Action Manual*, U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and

Applied Nutrition Ethyl Carbamate Preventative Action Manual. U.S., Food and Drug Administration. Washington: .
<http://www.cfsan.fda.gov/~acrobot/ecaction.pdf>. (28 April 2009).

27. Arena ME, Saguir FM, & Manca de Nadra MC. Arginine, Citrulline, and Ornithine Metabolism by Lactic Acid Bacteria from Wine. *Int J Food Microbiol*, 1999: **52**(3):155–161.
28. Said EG. *Bioindustri Penerapan Teknologi Fermentasi*. Jakarta: Mediyatama Sarana Perkasa, 1987: 20-21 & 23-25.
29. Handoyo Y. *Rahasia Wine*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama, 2007: 9-12 & 17.
30. McNair HM & Bonelli EJ. *Dasar Kromatografi Gas terbitan ke-5*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB, 1988: 1-14.
31. Gandjar IG & Rohman A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 2007: 419-442 & 463-470.
32. Johnson EL & Stevenson R. *Dasar Kromatografi Cair*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB, 1991: 246-248.



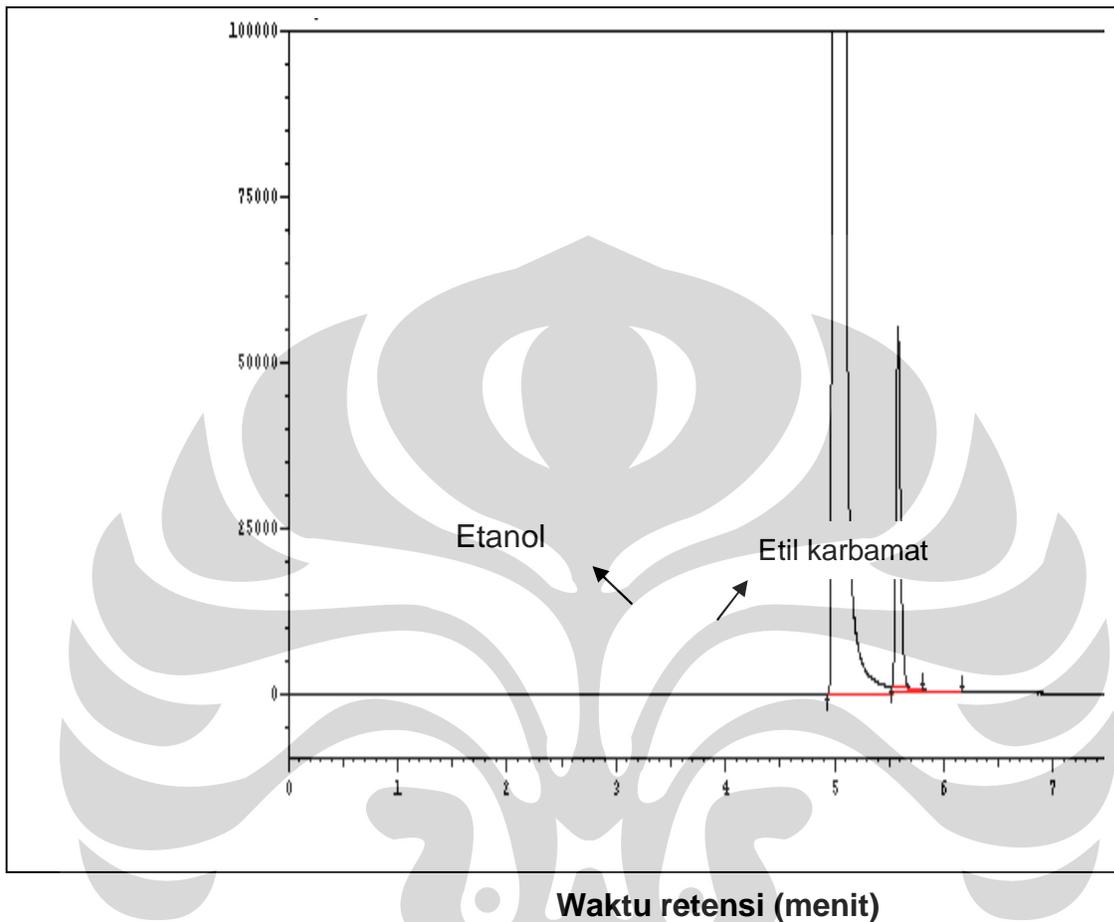


Gambar 2. Alat kromatografi gas Shimadzu GC – 17A.

Keterangan :

A = Unit utama

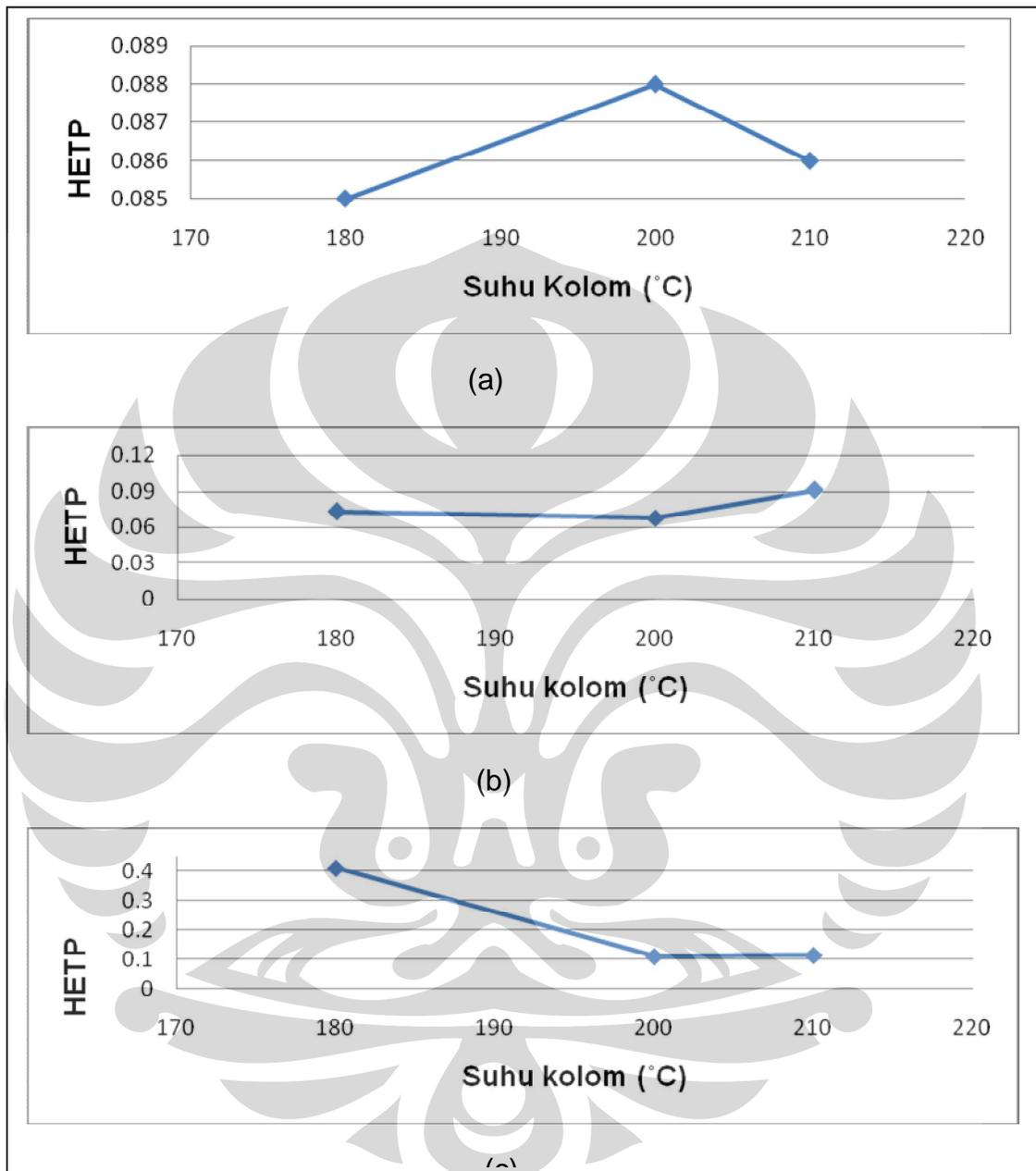
B = Sistem control



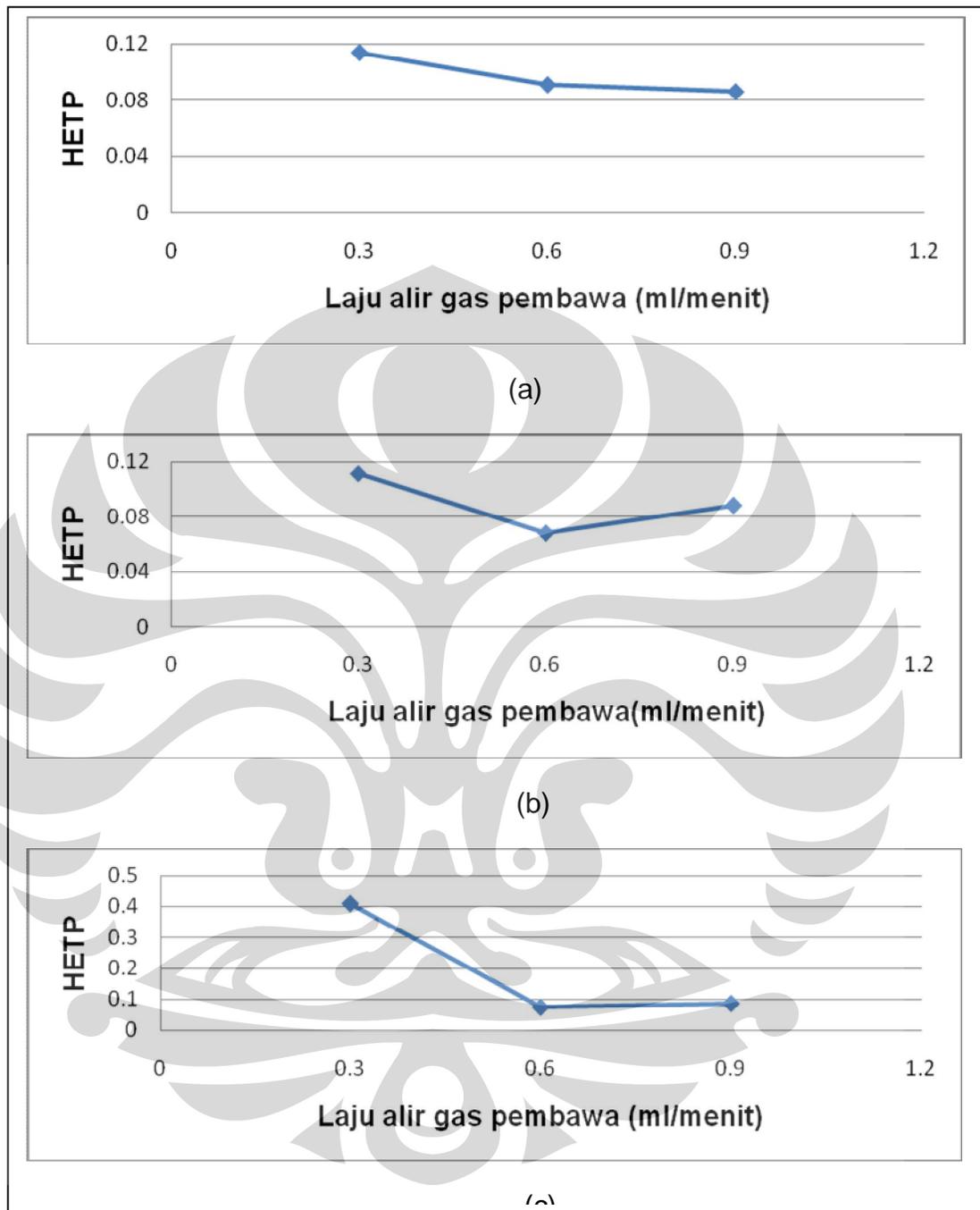
Gambar 3. Kromatogram standar etil karbamat 15010 µg/ml (waktu retensi etil karbamat 5,5 menit).

Kondisi analisis:

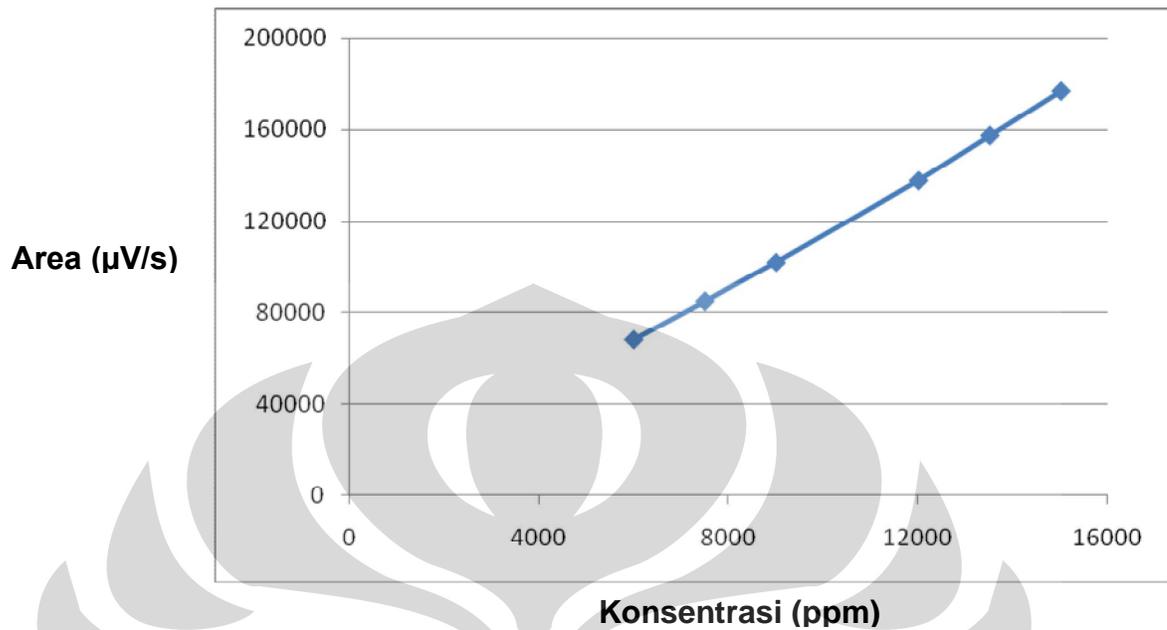
Kolom kapiler J&W, VB–Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 µm; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl.



Gambar 4. Kurva hubungan suhu kolom dan HETP dari larutan standar etil karbamat 15010 µg/ml dengan laju alir gas 0,9 ml/menit (a); 0,6 ml/menit (b); dan 0,3 ml/menit (c).



Gambar 5. Kurva hubungan laju alir gas pembawa dan HETP dari larutan standar etil karbamat 15010 $\mu\text{g/ml}$ dengan suhu awal kolom 210°C (a); 200°C (b); dan 180°C (c).



Gambar 6. Kurva kalibrasi standar etil karbamat.

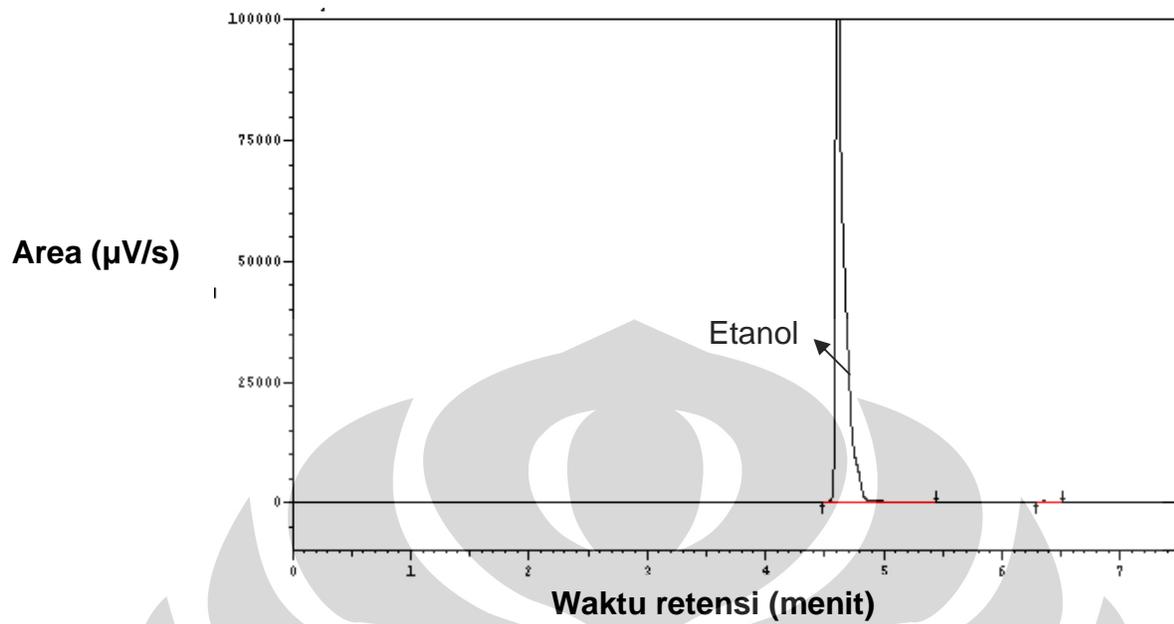
Keterangan :

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi etil karbamat :

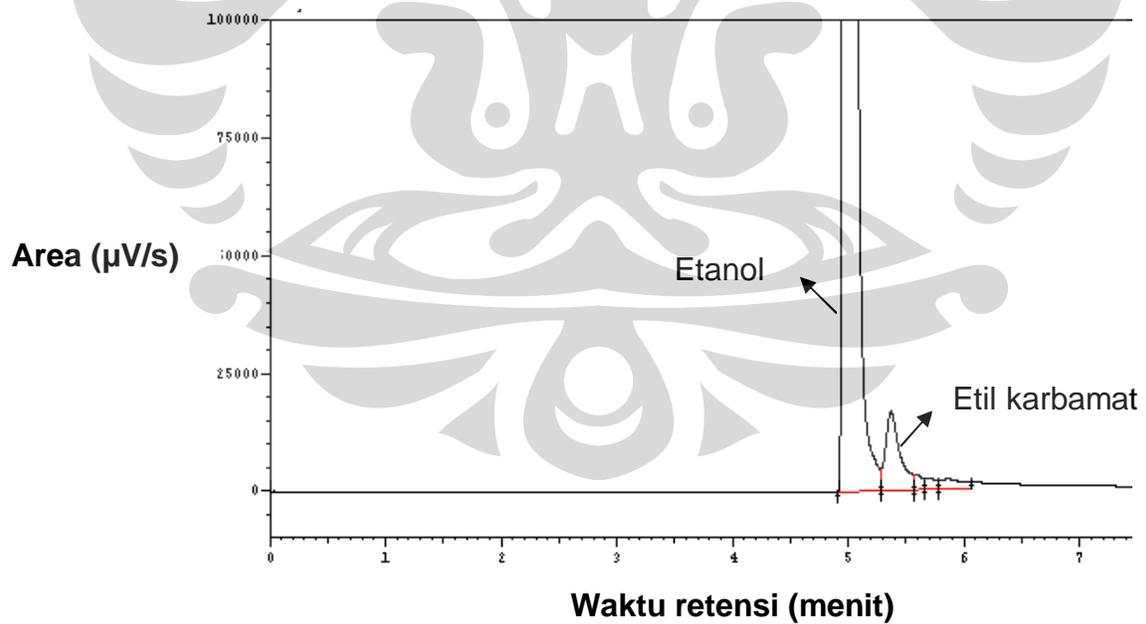
$$y = 12,108x - 10865,667 \text{ dengan koefisien korelasi } (r) = 0,9990$$

Kondisi analisis:

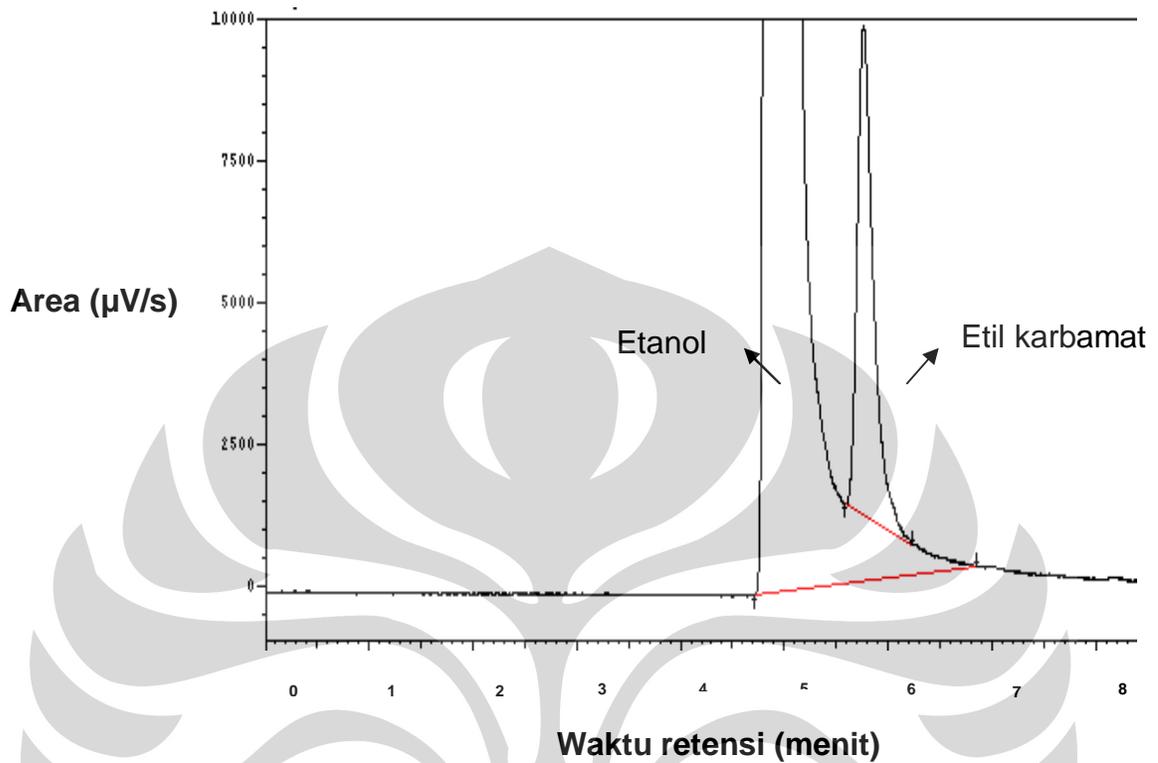
Kolom kapiler J&W, VB-Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 µm; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl.



Gambar 7. Kromatogram sampel minuman beralkohol A.



Gambar 8. Kromatogram sampel minuman beralkohol B.



Gambar 9. Kromatogram sampel minuman beralkohol C.

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB-Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .



Tabel 1

Pemilihan kondisi analisis optimum untuk analisis etil karbamat dalam minuman beralkohol dengan variasi suhu kolom dan laju alir gas pembawa

Suhu kolom (°C)	Laju alir gas pembawa (ml/menit)	Waktu retensi (menit)	Faktor ikutan	Jumlah lempeng teoritis (N)	HETP	Resolusi
210	0,3	9,730	2,160	52540,450	0,114	3,988
	0,6	5,420	1,139	66067,950	0,091	3,986
	0,9	4,033	1,327	69399,658	0,086	0,000
200	0,3	9,974	1,109	53905,730	0,111	4,896
	0,6	5,581	1,251	88397,016	0,068	4,622
	0,9	4,155	1,248	68069,805	0,088	0,000
180	0,3	6,254	1,106	14684,878	0,409	8,521
	0,6	5,701	1,068	81702,721	0,073	8,311
	0,9	4,639	1,062	70912,902	0,085	0,000

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB–Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 µm; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl.

Tabel 2

Data kurva kalibrasi standar etil karbamat

Konsentrasi (ppm)	Area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)
6004	64589
7505	78823
9006	96245
12008	132938
13509	153007
15010	172530

Keterangan :

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi etil karbamat :

$$y = 12,108x - 10865,667 \text{ dengan koefisien korelasi } (r) = 0,9990$$

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB-Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .

Tabel 3
Data linieritas etil karbamat

Konsentrasi (ppm)	Area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)	Δx	Δy	$\Delta y/\Delta x$
6004	64589	227,803	2758,235	12,108
7505	78823	97,611	1181,873	12,108
9006	96245	159,728	1933,981	12,108
12008	132938	131,252	1589,197	12,108
13509	153007	25,247	305,695	12,108
15010	172530	136,652	1654,587	12,108
$\bar{x} = 10507$				

$S (y/x) = 2127,300$

$b = 12,108$

$S_{x_0} = 175,694$

$V_{x_0} = 0,017$

Tabel 4

Data uji presisi etil karbamat

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Pengukuran (x') (ppm)	Konsentrasi rata-rata (\bar{x}) (ppm)	Simpangan baku (SD)	Koefisien variasi (KV) (%)
6004	63211	6117,151	6105,096	60,145	0,99
	61695	5992,787			
	63092	6108,165			
	62988	6099,576			
	63748	6162,344			
	63595	6149,708			
9006	94788	8725,939	8893,638	125,510	1,41
	97751	8970,653			
	98621	9042,506			
	97601	8958,264			
	95184	8758,644			
	96966	8905,820			
15010	172860	15173,907	15153,990	133,492	0,88
	174723	15327,772			
	172164	15116,424			
	170798	15003,606			
	170998	15020,124			
	174170	15282,100			

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB-Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .

Tabel 5

Data uji perolehan kembali etil karbamat sampel A

Minuman Beralkohol	Konsentrasi etil karbamat yang dimasukkan (ppm)	Area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)	Konsetrasi Pengukuran (ppm)	UPK (%)	UPK rata-rata
Minuman beralkohol blanko	0	-	-	-	-
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	6980	75271	7114,029	101,92	101,61
		74908	7084,049	101,49	
		74853	7079,507	101,43	
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	8650	94788	8725,939	100,88	101,00
		95630	8795,480	100,87	
		95183	8758,562	101,25	
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	10380	117037	10563,484	101,77	101,42
		116594	10526,897	101,4	
		116175	10492,292	101,08	

Keterangan: - (tidak terdeteksi)

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB–Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .

Tabel 6

Data uji perolehan kembali etil karbamat sampel B

Minuman Beralkohol	Konsentrasi etil karbamat yang dimasukkan (ppm)	Area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)	Konsetrasi Pengukuran (ppm)	UPK (%)	UPK rata-rata
Minuman beralkohol blanko	0	85720 70519 76684	7977,012 6721,561 7231,142	-	-
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	5850	147969 147766 148603	13118,159 13101,393 13170,521	99,29 99,00 100,18	99,49
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	6720	159595 158936 158372	14078,350 14023,924 13977,343	100,72 99,91 99,22	99,95
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	8770	183549 184317 183255	16056,712 16120,141 16032,430	99,73 100,46 99,46	99,88

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB–Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .

Tabel 7

Data uji perolehan kembali etil karbamat sampel C

Minuman Beralkohol	Konsentrasi etil karbamat yang dimasukkan (ppm)	Area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)	Konsetrasi Pengukuran (ppm)	UPK (%)	UPK rata-rata
Minuman beralkohol blanko	0	93943	8656,150	-	-
		93656	8632,447		
		93546	8623,362		
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	6980	178698	15656,068	100,55	101,05
		179870	15752,863	101,94	
		178793	15663,914	100,67	
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	8650	198167	17264,013	99,73	99,71
		196389	17117,168	98,03	
		199884	17405,820	101,37	
Minuman beralkohol + standar etil karbamat	10380	220794	19132,777	101,11	100,28
		218133	18913,005	98,99	
		220320	19093,630	100,73	

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB–Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .

Tabel 8

Data batas deteksi dan batas kuantitasi etil karbamat

Konsentrasi (ppm)	Area (y) etil karbamat (µV/s)	y'	(y-y')²
6004	64589	61830,765	7607860,315
7505	78823	80004,873	1396823,788
9006	96245	98178,981	3740282,508
12008	132938	134527,197	2525547,105
13509	153007	152701,305	93449,433
15010	172530	170875,413	2737658,141
			Σ = 18101621,29

Persamaan regresi linier etil karbamat :

$$y = 12,108x - 10865,667 \text{ dengan koefisien korelasi } (r) = 0,9990$$

$$S (y/x) = 2127,300$$

$$b = 12,108$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = 0,527 \mu\text{g/l}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = 2,005 \mu\text{g/l}$$

Tabel 9

Data penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol

Sampel	Area	Konsentrasi	Konsentrasi
Minuman beralkohol	etil karbamat	etil karbamat	etil karbamat
	($\mu\text{V/s}$)	(ppm)	rata – rata (ppm)
A	-	-	-
	-	-	
	-	-	
B	71767	6824,63	
	76191	7190,02	7062,96 \pm 0,168
	76000	7174,24	
C	102370	9352,14	
	103980	9485,11	9375,62 \pm 0,081
	101613	9289,62	

Keterangan: - (tidak terdeteksi)

Kondisi analisis:

Kolom kapiler J&W, VB–Wax berukuran 60 m x 0,32 mm x 0,25 μm ; suhu injektor dan suhu detektor 230°C; suhu kolom 200°C dengan laju alir gas pembawa 0,6 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .



Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis :

$$y = a + bx$$

a (*intercept*) dan b (*slope*) dapat dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{(\Sigma y) (\Sigma x^2) - (\Sigma x) (\Sigma xy)}{n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

$$b = \frac{n (\Sigma xy) - ((\Sigma x) (\Sigma y))}{n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2}$$

Linieritas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{(n (\Sigma xy) - ((\Sigma x) (\Sigma y)))}{\sqrt{(n (\Sigma x^2) - (\Sigma x)^2) (n (\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2)}}$$

Lampiran 2

Cara perhitungan uji presisi

$$\text{Rata - rata} \quad : \bar{x} = \frac{(\sum x)}{n}$$

$$\text{Simpangan baku} \quad : SD = \sqrt{\frac{\sum(x' - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Koefisien variasi} \quad : KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Contoh :

Hasil pengukuran standar etil karbamat untuk data presisi

konsentrasi rendah :

Konsentrasi rata - rata (\bar{x}) = 6105,096 ppm

$$SD = \sqrt{\frac{(6117,151 - 6105,096)^2 + \dots + (6149,708 - 6105,096)^2}{6 - 1}} = 60,145$$

$$KV = \frac{60,145}{6105,096} \times 100\% = 0,99 \%$$

Lampiran 3

Cara perhitungan uji perolehan kembali

Perhitungan UPK dengan metode adisi :

$$\text{Persen perolehan kembali: \% UPK} = \frac{C_a - C_b}{C} \times 100\%$$

C_a = konsentrasi etil karbamat dalam sampel minuman beralkohol yang telah ditambahkan standar etil karbamat

C_b = konsentrasi etil karbamat dalam sampel minuman beralkohol blanko

C = konsentrasi etil karbamat sebenarnya yang ditambahkan

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi etil karbamat : $y = 12,108x - 10865,667$

y = area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)

x = konsentrasi etil karbamat (ppm)

Pada sampel minuman beralkohol yang ditambahkan standar etil karbamat dengan konsentrasi 6980 ppm diperoleh area etil karbamat sebesar 178698 ($\mu\text{V/s}$) \rightarrow diplot ke persamaan regresi linier etil karbamat, maka $x = 15656,068$ ppm.

Pada sampel minuman beralkohol tanpa penambahan standar etil karbamat (blanko) diperoleh area etil karbamat sebesar 93943 ($\mu\text{V/s}$) \rightarrow diplot ke persamaan regresi linier etil karbamat, maka $x = 8656,150$ ppm.

$$\% \text{UPK} = \frac{15656,068 - 8656,150}{6980} = 100,55 \%$$



Lampiran 4

Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi, dan linearitas

$$\text{Simpangan baku residual : } S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum(y - y')^2}{n - 2}}$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 S(y/x)}{b}$$

$$\text{Standar deviasi dari fungsi} = S_{x_0} = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi} = V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{x}}$$

Contoh :

Persamaan kurva kalibrasi etil karbamat : $y = 12,108x + 10865,667x$

$$S(y/x) = \sqrt{\frac{(64589 - 61830,765)^2 + \dots + (172530 - 170875,413)^2}{6 - 2}}$$
$$= 2127,300$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 \times 2127,300}{10865,667} = 527,081 \text{ ppm}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 \times 2127,300}{10865,667} = 2004,708 \text{ ppm}$$

$$S_{x_0} = \frac{2127,300}{10865,667} = 175,694$$

$$V_{x_0} = \frac{175,694}{10507} = 0,017$$

Lampiran 5

Cara perhitungan kadar zat dalam sampel

Contoh perhitungan kadar etil karbamat dalam sampel :

Persamaan kurva kalibrasi etil karbamat : $y = 12,108x - 10865,667$

y = area etil karbamat ($\mu\text{V/s}$)

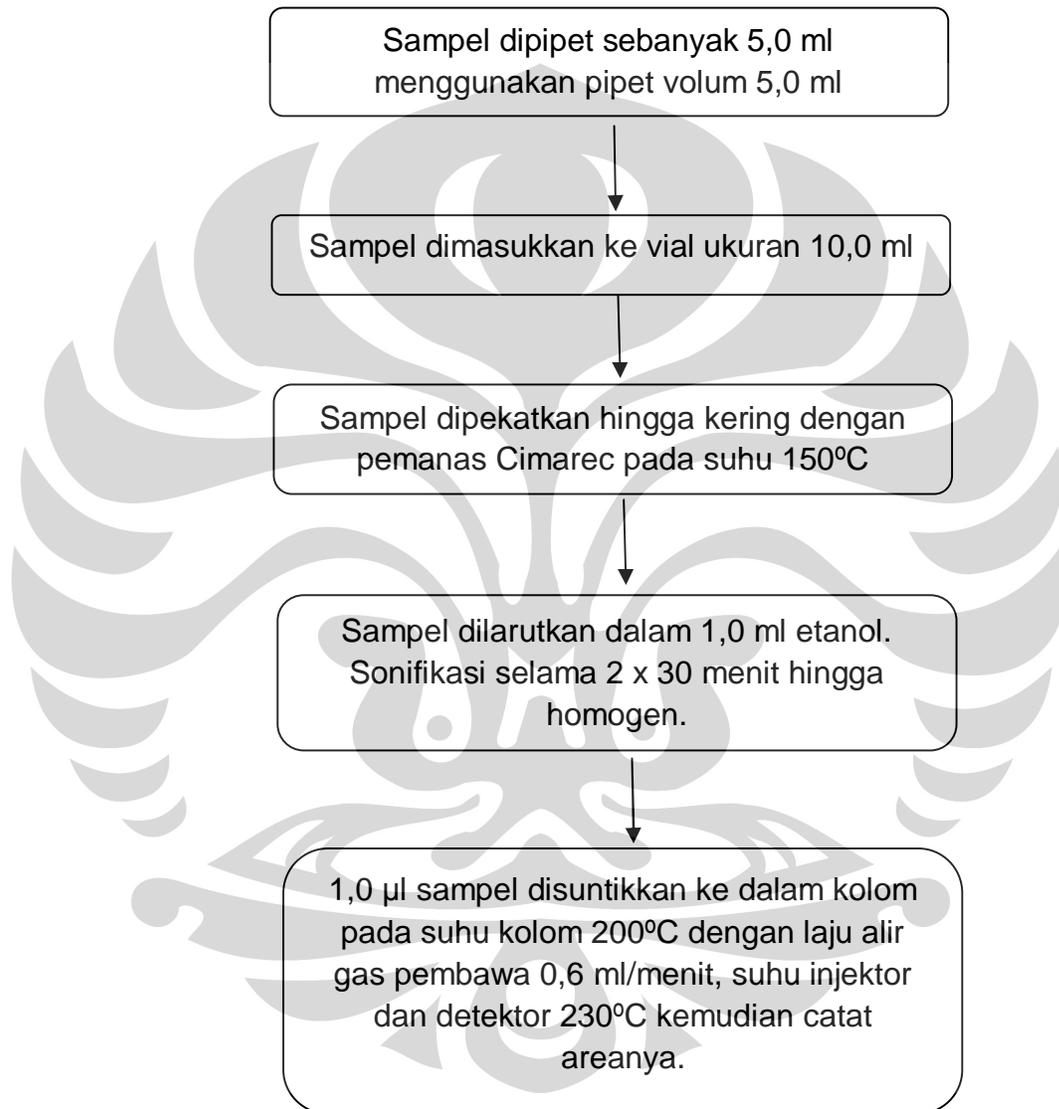
x = kadar etil karbamat (ppm)

Area etil karbamat dalam sampel = 71767 ($\mu\text{V/s}$) → diplot ke persamaan regresi linier etil karbamat, maka $x = 6824,634$ ppm

Maka kadar etil karbamat dalam 1,0 ml minuman beralkohol adalah 6824,634 ppm

Lampiran 6

Skema penetapan kadar etil karbamat dalam minuman beralkohol



Lampiran 7

Sertifikat analisis standar etil karbamat

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name Urethane,
≥99%
Product Number U2500
Product Brand SIGMA
CAS Number 51-79-6
Molecular Formula NH₂COOC₂H₅
Molecular Weight 89.09

TEST	SPECIFICATION	LOT 058K0702 RESULTS
APPEARANCE	WHITE POWDER	CONFORMS
SOLUBILITY	CLEAR COLORLESS SOLUTION AT 1G PLUS 10ML WATER	CONFORMS
PROTON NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
CARBON-13 NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
PURITY BY GAS CHROMATOGRAPHY	MINIMUM 99%	100%
PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY	MINIMUM 99%	99%
QC RELEASE DATE		MAY 2008
PRODUCT CROSS REFERENCE INFORMATION		REPLACEMENT FOR ALDRICH #U002857



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA