



**VALIDASI METODE PENETAPAN KUANTITATIF  
METANOL DALAM URIN MENGGUNAKAN GAS  
*CHROMATOGRAPHY-FLAME IONIZATION  
DETECTOR***

SKRIPSI  
disusun sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains  
Program Studi Kimia

oleh  
Elyta Mariana  
4311414027

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG  
2018**

## PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini bebas plagiat, dan apabila di kemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam skripsi ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan perundang-undangan.

Semarang, 13 September 2018



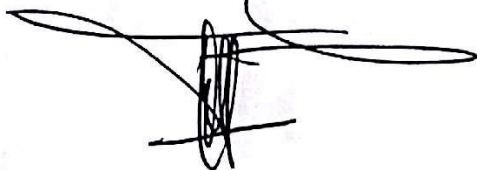
Elyta Mariana  
4311414027

## PERSETUJUAN PEMBIMBING

Skripsi ini telah disetujui oleh pembimbing untuk diajukan ke Sidang Panitia Skripsi Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang.

Semarang, 27 Agustus 2018

Pembimbing I



Prof. Dr. Edy Cahyono, M.Si.  
NIP. 196412051990021001

Pembimbing II



Endah Fitriani Rahayu, S.Si., M.Sc.  
NIP. 198705202014042002

# PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul

Validasi Metode Penetapan Kuantitatif Metanol dalam Urin Menggunakan  
*Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*

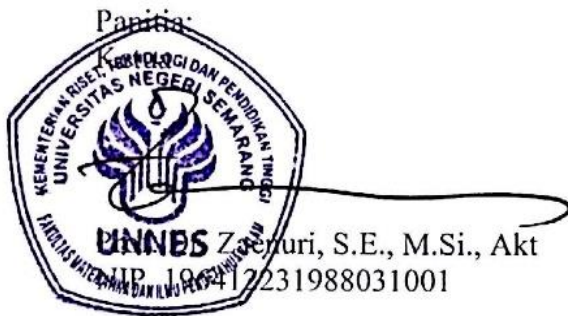
Disusun oleh

Elyta Mariana

4311414027

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Skripsi FMIPA UNNES pada tanggal  
5 September 2018.

Semarang, 13 September 2018



Sekretaris

Dr. Nanik Wijayati, M.Si.  
NIP. 196910231996032001

Ketua Penguji

Agung Tri-Prasetya, S. Si., M.Si.  
NIP. 196904041994021001

Anggota Penguji/  
Pembimbing I

Prof. Dr. Edy Cahyono, M.Si.  
NIP. 196412051990021001

Anggota Penguji/  
Pembimbing II

Endah Fitriani Rahayu, S.Si., M.Sc.  
NIP. 198705202014042002

## **HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN**

Motto:

Dan untuk (memenuhi perintah) Tuhanmu, bersabarlah. (QS. Al-Mudatsir: 7)

Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang berilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah mengetahui apa yang kamu kerjakan. (QS. Al-Mujadilah: 11)

Urusan seorang mukmin patut dikagumi. Semua urusannya merupakan kebaikan bagi dirinya dan tidak terkecuali pada diri seorang mukmin. Apabila memperoleh kesenangan dia bersyukur dan itu baik untuk dirinya. Dan bila ditimpa kesusahan dia bersabar dan itu baik untuk dirinya. (HR. Muslim)

Persembahan:

Untuk Ayah, Ibu, dan Adik-adik.

## **PRAKATA**

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan berjudul “Validasi Metode Penetapan Kuantitatif Metanol dalam Urin Menggunakan *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector*”. Penulis mengucapkan terimakasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini diantaranya:

1. Allah SWT yang telah memberi kehidupan serta segala berkah dan anugerah sehingga memungkinkan penulis untuk berguna bagi orang lain.
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA UNNES.
3. Kepala Laboratorium Forensik Cabang Semarang.
4. Prof. Dr. Edy Cahyono, M.Si. Dosen Pembimbing I yang telah memberikan dukungan, arahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi.
5. Endah Fitriani Rahayu, S.Si., M.Sc. Dosen Pembimbing II yang telah memberikan dukungan, arahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi.
6. Agung Tri Prasetya, S. Si., M.Si. Dosen Penguji yang telah memberikan saran dan masukan untuk penyempurnaan skripsi.
7. Bowo Nurcahyo, S.Si., M.Biotech. Pembimbing lapangan yang telah memberikan saran dan arahan dalam pelaksanaan penelitian.
8. Kasubbid dan Staff Subbid Kimbiofor yang telah memberikan arahan selama penelitian.
9. Hartias Rizalina, Arisma Yanti, dan Ahmad Akhib Ainul Yaqin yang telah membantu dan mendampingi selama penelitian.
10. Orang tua serta keluarga besar, terima kasih untuk segala dukungan, pengorbanan, cinta dan do'a.
11. Seluruh pihak yang telah membantu dari pelaksanaan penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.

Kritik dan saran yang membangun dari berbagai pihak penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi berbagai pihak yang membutuhkan.

Semarang, 27 Agustus 2018

Penulis

## ABSTRAK

Mariana, Elyta. 2018. Validasi Metode Penetapan Kuantitatif Metanol dalam Urin Menggunakan Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Pembimbing Prof. Dr. Edy Cahyono, M.Si., Endah Fitriani Rahayu, S.Si., M.Sc., Bowo Nurcahyo, S.Si., M.Biotech.

**Kata Kunci:** metanol, *Gas Chromatography*, uji validitas

Telah dilakukan uji validitas terhadap tiga metode preparasi analisis metanol dalam urin dengan distilasi, ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat menggunakan *gas chromatography*. Metode *gas chromatography-flame ionization detector* (GC-FID) dapat digunakan untuk menentukan kadar metanol dalam urin. Pada uji validasi ditambahkan standar internal propanol. Uji validitas yang dilakukan meliputi uji linearitas, akurasi, presisi serta penentuan *limit of detection* (LoD) dan *limit of quantitation* (LoQ). Linearitas kurva standar dengan GC-FID diperoleh sebesar 0,9998 dengan nilai LoD sebesar 0,0743% dan nilai LoQ sebesar 0,2477%. Uji akurasi dilakukan dengan menghitung persen *recovery* yaitu 95,56% untuk metode distilasi, 62,40% untuk metode ekstraksi cair-cair dan 66,55% untuk metode ekstraksi fase padat. Hasil uji presisi dengan metode distilasi diperoleh %RSD sebesar 2,03%. Sedangkan %RSD metode ekstraksi cair-cair 3,00% dan 6,77% dengan ekstraksi fase padat. Berdasarkan hasil analisis uji validitas disimpulkan bahwa metode distilasi lebih baik daripada metode ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat.

## ABSTRACT

Mariana, Elyta. 2018. Validation Methods for Quantitative Determination of Metanol in Urine Using Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. Skripsi, Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Supervisor Prof. Dr. Edy Cahyono, M.Si., Endah Fitriani Rahayu, S.Si., M.Sc., Bowo Nurcahyo, S.Si., M.Biotech.

**Kata Kunci:** Methanol, Gas Chromatography, Validity Test

Validity test has been carried out against three preparation methods for methanol analysis in urine by distillation, liquid-liquid extraction and solid phase extraction using gas chromatography. The method of *gas chromatography-flame ionization detector* (GC-FID) can be used to determine the levels of methanol in urine. In the validation test an internal standard of n-propanol was added. Validity tests included linearity test, accuracy and precision test, and determining the *limit of detection* (LoD) and *limit of quantitation* (LoQ). The linearity of the standard curve obtained by GC-FID is 0.9998 with LoD value of 0.0743% and LoQ value of 0.2477%. Accuracy test is done by calculating the percent recovery, which is 95.56% for distillation method, 62.40% for the liquid-liquid extraction method and 66.55% for the solid phase extraction method. The result of precision test by distillation method acquired %RSD of 2.03%. Meanwhile, %RSD by liquid-liquid extraction is 3.00% and 6.77% by solid phase extraction. Based on the results of the validity test analysis concluded that distillation method is better than liquid-liquid extraction and solid phase extraction method.



# DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN .....	ii
PERSETUJUAN PEMBIMBING .....	iii
PENGESAHAN .....	iv
HALAMAN MOTTO DAN PERSEMBAHAN .....	v
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Tujuan.....	3
1.4. Manfaat.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	5
2.1 Minuman Beralkohol.....	5
2.2 Metanol.....	6
2.3 Urin.....	7
2.4 Distilasi.....	9
2.5 Ekstraksi .....	10
2.6 <i>Gas Chromatography</i> .....	15
2.7 Validasi.....	17
2.8 Penelitian Terkait .....	22
BAB 3 METODE PENELITIAN .....	24
3.1 Lokasi Penelitian .....	24
3.2 Variabel Penelitian .....	24
3.3 Alat dan Bahan .....	25
3.4 Prosedur Penelitian.....	25
3.5 Validasi Metode .....	27
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....	28
4.1 Preparasi sampel.....	28
4.2 Analisis dengan <i>Gas Chromatography</i> (GC).....	30
4.3 Uji Linearitas .....	33
4.4 Uji Limit of Detection (LoD) dan Limit of Quantitation (LoQ) .....	36
4.5 Uji Akurasi .....	38
4.6 Uji Presisi .....	43
4.7 Perbandingan Validitas Metode Preparasi .....	45
BAB 5 PENUTUP .....	49

5.1. Simpulan.....	49
5.2. Saran.....	49
DAFTAR PUSTAKA .....	50
LAMPIRAN.....	54

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Pemisahan dua solut dengan satu kali ekstraksi dan volume sama .....	12
Tabel 2. 2 Penentuan batasan awal <i>%Recovery</i> .....	20
Tabel 4.1 Hasil pengukuran larutan standar metanol GC-FID .....	34
Tabel 4.2 Hasil analisis LoD dan LoQ pada GC-FID.....	36
Tabel 4.3 Hasil analisis uji recovery distilasi dengan GC-FID .....	39
Tabel 4.4 Hasil analisis uji recovery ekstraksi cair-cair dengan GC-FID .....	39
Tabel 4.5 Hasil analisis <i>uji recovery</i> ekstraksi fase padat dengan GC-FID.....	40
Tabel 4.6 Hasil analisis %RSD metode distilasi dengan GC-FID.....	43
Tabel 4.7 Hasil analisis %RSD metode ekstraksi cair-cair dengan GC-FID.....	43
Tabel 4.8 Hasil analisis %RSD metode ekstraksi fase padat dengan GC-FID.....	44

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Metabolisme metanol dalam tubuh .....	7
Gambar 2.2 Skema diagram distilasi konvensional .....	10
Gambar 2.3 Prinsip ekstraksi cair-cair .....	13
Gambar 2.4 Proses ekstraksi fase padat .....	14
Gambar 2.5 Bagian-bagian alat <i>gas chromatography</i> .....	16
Gambar 4.1 Kromatogram urin metode distilasi dengan GC-FID.....	31
Gambar 4.2 Kromatogram darah metode distilasi dengan HS GC-FID .....	31
Gambar 4.3 Kromatogram pembanding metanol.....	31
Gambar 4.4 Kromatogram pembanding propanol .....	32
Gambar 4.5 Kromatogram urin metode ekstraksi cair-cair dengan GC-FID.....	32
Gambar 4.6 Kromatogram urin metode ekstraksi fase padat dengan GC-FID....	32
Gambar 4.7 Kurva kalibrasi pengukuran GC-FID pada standar metanol.....	34
Gambar 4.8 Limit deteksi, limit kuantitasi dan daerah kerja GC-FID.....	37

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Diagram alir.....	54
Lampiran 2 Perhitungan pembuatan larutan .....	61
Lampiran 3 Analisis data LoD dan LoQ pada GC-FID .....	63
Lampiran 4 Analisis data uji akurasi dengan GC-FID.....	64
Lampiran 5 Analisis data uji presisi.....	81
Lampiran 6 Dokumentasi penelitian .....	83
Lampiran 7 Kromatogram <i>Gas Chromatography</i> (GC) .....	84

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Minuman keras atau yang biasa disebut minuman beralkohol telah dikenal manusia kurang lebih 500 tahun yang lalu. Menurut Peraturan Presiden Republik Indonesia No. 74 Tahun 2013, minuman beralkohol tradisional adalah minuman beralkohol yang dibuat secara tradisional dan turun temurun yang dikemas secara sederhana dan pembuatannya dilakukan sewaktu-waktu, serta dipergunakan untuk kebutuhan adat istiadat atau upacara keagamaan. Ritual adat inilah yang mendorong anggota masyarakat untuk mengkonsumsi minuman keras tradisional tersebut.

Masyarakat di beberapa wilayah di Indonesia banyak mengkonsumsi minuman beralkohol yang dicampur atau biasa disebut dengan minuman keras oplosan. Salah satu jenis minuman beralkohol tradisional yang sering dijumpai di Indonesia adalah *ciu* yang terbuat dari hasil fermentasi limbah cair yaitu tetesan tebu yang difermentasikan dan mengalami proses distilasi. Senyawa yang terdapat pada *ciu* yaitu etanol dan asam sitrat dengan kadar rata-rata 6,82% (Widyanti, 2010).

Pada tahun 2011 hingga sekarang terdapat 35 kasus penyalahgunaan minuman beralkohol khususnya pada miras oplosan yang menyebabkan kematian di Polda Jateng dan DIY. Salah satu kasus yang menyebabkan kematian yaitu kasus penyalahgunaan miras oplosan dari Polres Brebes tahun 2016. Berdasarkan hasil pemeriksaan yang dilakukan oleh tim forensik cabang Semarang terhadap barang bukti berupa *ciu* brangkal, lambung, urin, dan darah ditemukan bahwa minuman keras oplosan yang diedarkan mengandung etanol 18,16% dan metanol 0,01%.

Metanol adalah sejenis alkohol yang digunakan sebagai pelarut cat, pembersih dan penghapus cat. Metanol sering digunakan untuk produksi minuman anggur dan wine karena harganya murah dan mudah didapat. Selain itu, penambahan induksi enzim pektolitik pada sari buah apel dapat meningkatkan kadar metanol pada fermentasi produk (Wang *et al.*, 2004). Penggunaan metanol untuk konsumsi tidak dibenarkan karena metanol adalah zat tidak layak konsumsi dan beracun bagi tubuh. Efek utama metanol dapat memabukkan, produk

metaboliknya dapat menyebabkan asidosis metabolik, kebutaan, dan kematian setelah periode laten 6-48 jam (Hamidah & Yulianti, 2017).

Metanol dapat diserap dalam tubuh, terabsorpsi dan terdistribusi ke dalam cairan tubuh. Proses pemecahan metanol dalam tubuh dapat terjadi dengan cara oksidasi metanol menjadi formaldehid kemudian menjadi asam format dan juga dapat langsung diekskresikan melalui urin atau dapat dilanjutkan dengan proses oksidasi yang merubah metanol menjadi karbon dioksida (Dorokhov *et al.*, 2015). Asam format ini menyebabkan berbagai efek toksik dalam tubuh. Akan tetapi, pengujian yang dilakukan bukanlah penentuan asam format melainkan metanol dalam urin. Hal ini dikarenakan apabila ditemukan metanol dalam urin maka jumlah *Aldehida Dehidrogenase* (ALDH) dalam tubuh telah habis sehingga tidak dapat mengubah metanol menjadi asam format. Selain itu, sumber asam format tidak hanya berasal dari metabolisme metanol saja melainkan dapat dihasilkan melalui metabolisme zat yang lain.

Pemeriksaan kadar metanol dapat ditentukan melalui spesimen biologi seperti: cairan biologis (darah, urin, air ludah), jaringan biologis atau organ tubuh. Pemeriksaan metanol dalam urin lebih akurat karena kadar metanol dalam urin lebih stabil (Nisak, 2008). Dikarenakan sifat urin yang memiliki tingkat kekeruhan tinggi sehingga diperlukan suatu metode preparasi atau perlakuan awal. Preparasi sampel merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan analisis toksikologi forensik disamping kehandalan penguasaan metode analisis instrumentasi.

Metode preparasi penentuan metanol dapat menggunakan distilasi dan ekstraksi. Sudhaker & Jain (2016) telah melakukan preparasi sampel pada urin dan darah dengan distilasi menggunakan pelarut air dan penambahan asam tartrat sebagai agen deprotenasi. Sedangkan Hernanz *et al.* (2008) telah melakukan penelitian senyawa volatil dengan preparasi menggunakan ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat. Penggunaan pelarut diklorometana memberikan *recovery* yang tinggi dalam berbagai penelitian penentuan senyawa volatil. Sedangkan florisisil dilaporkan sukses sebagai adsorben yang dapat menjerap pengotor. Florisisil memiliki kemampuan adsorpsi yang bagus berdasarkan interaksi semipolar dan harganya yang murah (Lukic *et al.*, 2006). Dikarenakan kloroform bersifat hampir

mirip dengan diklorometana, maka kloroform dipilih sebagai pelarut dan eluen pada ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat (Puslabfor Bareskrim Polri, 2017).

Hasil yang didapatkan dari ketiga metode preparasi diukur kadarnya dan diketahui jenis alkohol yang terkandung pada minuman tersebut. Pengukuran kadar dan penentuan jenis alkohol dilakukan menggunakan instrumen *Gas Chromatography* (GC). Kromatografi gas merupakan metode pengukuran secara kualitatif dan kuantitatif untuk bahan-bahan yang mudah menguap serta stabil pada pemanasan tinggi. Etanol dan metanol dapat dianalisis menggunakan kromatografi gas karena merupakan senyawa volatil sehingga memenuhi syarat untuk ditetapkan kadarnya melalui kromatografi gas (Dean, 1995). Metode analisis yang akurat digunakan di laboratorium untuk pengujian etanol dalam urin pada penyalahgunaan minuman beralkohol umumnya menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Metode ini spesifik untuk identifikasi dan penentuan kadar etanol serta dapat digunakan untuk pemisahan campuran alkohol seperti metanol dan isopropanol secara simultan (Hendrayana, 2006).

Penentuan metode preparasi yang tepat sangat diperlukan pada penentuan kuantitatif metanol dikarenakan sampel yang diterima sebagian besar merupakan materi biologis, sehingga sedapat mungkin mencegah terjadinya penguraian dari analit. Perolehan kembali yang tinggi pada ekstraksi adalah sangat penting untuk mencari semua analit, sedangkan selektifitas yang tinggi diperlukan untuk menjamin pengotor atau senyawa pengganggu terpisahkan dari analit. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu metode preparasi yang tepat dalam penentuan kuantitatif metanol dalam urin.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian pada latar belakang, rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu metode preparasi apakah yang paling tepat terhadap penentuan kuantitatif metanol dalam urin yang diuji dengan *Gas Chromatography* (GC)?

## **1.3. Tujuan**

Tujuan penelitian yang diharapkan dalam penelitian ini yaitu mengetahui metode preparasi yang paling tepat terhadap penentuan kuantitatif metanol dalam urin yang diuji dengan *Gas Chromatography* (GC).



#### **1.4. Manfaat**

Manfaat yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai hasil uji validitas metode preparasi terhadap konsentrasi metanol dalam urin yang diuji dengan *Gas Chromatography* (GC).
2. Memberikan informasi mengenai metode preparasi yang paling tepat terhadap penentuan kuantitatif metanol dalam urin yang diuji dengan *Gas Chromatography* (GC).

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Minuman Beralkohol**

Minuman beralkohol atau yang biasa disebut minuman keras menurut Peraturan Presiden Republik Indonesia No. 74 Tahun 2013 adalah minuman yang mengandung etanol ( $C_2H_5OH$ ) yang diproses dari bahan hasil pertanian yang mengandung karbohidrat dengan cara fermentasi dan distilasi atau fermentasi tanpa distilasi. Minuman beralkohol dibuat dengan cara fermentasi khamir dari bahan baku yang mengandung pati atau gula tinggi. Bahan baku yang umum dipakai adalah biji-bijian (seperti jagung, beras, gandum), umbi-umbian (seperti kentang dan ubi kayu), buah-buahan (seperti anggur, apel), tanaman palem (seperti aren, kelapa, siwalan, nipah), dan gula tebu.

Beberapa minuman beralkohol diperbolehkan beredar tetapi tetap dalam pengawasan ketat berupa pengawasan dalam produksi, peredaran, dan penjualan. Peraturan Presiden Republik Indonesia No. 74 Tahun 2013, dijelaskan beberapa golongan minuman beralkohol, yaitu:

- a. Golongan A: minuman yang mengandung etanol dengan kadar sampai dengan 5%.
- b. Golongan B: minuman yang mengandung etanol dengan kadar lebih dari 5% sampai dengan 20%.
- c. Golongan C: minuman yang mengandung etanol dengan kadar lebih dari 20% sampai dengan 50%.

Kadar etanol yang tinggi dapat diperoleh dalam arak dengan beberapa kali distilasi untuk tujuan bahan bakar (Yeliana & Wirawan, 2005). Telah dilakukan penentuan kadar etanol dalam arak yang beredar di pasaran dengan kadar etanol sekitar 20,08–70,08% (b/v). Minuman beralkohol yang mempunyai kadar etanol melebihi 55% dapat menyebabkan keracunan bahkan kematian (Suaniti & Widya, 2011). Hal ini merupakan salah satu kasus penyalahgunaan minuman beralkohol yang terjadi di masyarakat.

Masyarakat di beberapa wilayah di Indonesia banyak mengonsumsi minuman beralkohol yang dicampur atau biasa disebut dengan miras oplosan.

Minuman beralkohol dioplos dimaksudkan untuk mempercepat sensasi euforia. Efek ini dihasilkan oleh kadar alkohol yang terkandung dalam jenis minuman yang merupakan zat psikoaktif.

Minuman keras oplosan lebih berbahaya dibandingkan dengan minuman keras biasa karena minuman keras oplosan merupakan minuman keras berkadar alkohol tinggi yang diracik sendiri dengan cara mencampurkan bahan lain-lain kedalamnya. Pada produk tertentu, untuk menghasilkan cita rasa yang diinginkan, dapat dilakukan penambahan bahan-bahan tertentu seperti herba, buah-buahan, ataupun bahan *flavoring*. Penambahan air rendaman beberapa binatang yang telah diawetkan dimaksudkan sebagai jamu atau sebagai obat kuat. Penambahan susu, madu, minuman bersoda dan minuman berenergi dapat menurunkan kadar alkohol sekitar 3,53-14,45% (Lestari, 2015).

Berbeda dari miras biasanya yang dijual secara legal, miras oplosan mengandung metil alkohol atau metanol. Metanol biasanya dipakai untuk bahan industri sebagai pelarut, pembersih dan penghapus cat. Metanol biasanya dapat ditemukan dalam aseton. Tanpa dicampur apapun, metanol sangat berbahaya bagi kesehatan bahkan bisa menyebabkan kematian. Apalagi dicampur dengan berbagai bahan lain yang tidak jelas jenis dan kandungannya.

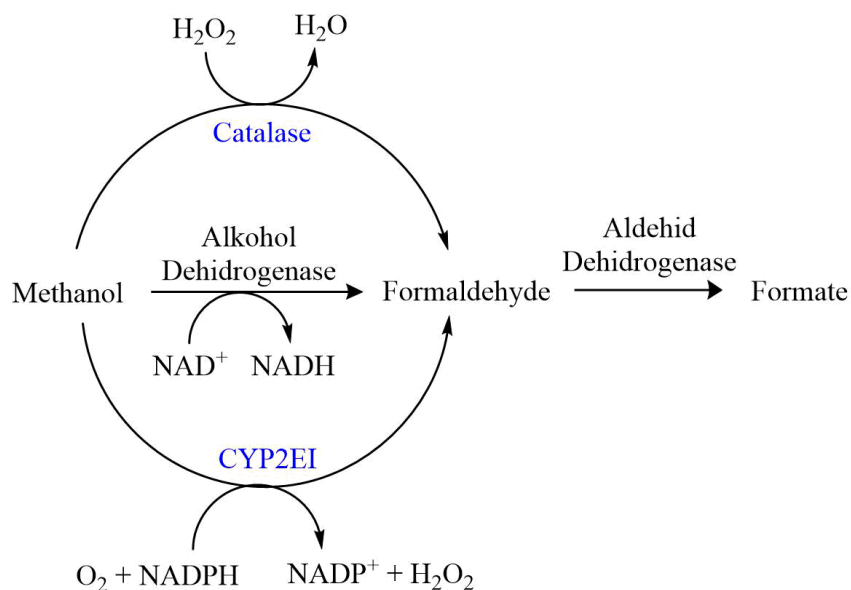
## 2.2 Metanol

Metanol atau metil alkohol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) merupakan alkohol beracun bagi mamalia dan banyak digunakan sebagai pelarut untuk ekstraksi (Wang *et al.*, 2004). Metanol dibuat melalui distilasi kayu keras, berbentuk cairan bening, berbau khas dan memiliki titik didih  $64,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Dalam dunia industri, metanol digunakan sebagai bahan pembuatan asetaldehid, cairan antibeku, pestisida dan pelarut. Pada kendaraan bermotor, metanol digunakan sebagai bahan bakar mobil formula. Metanol juga terdapat pada buah-buahan, sayuran segar, jus buah, minuman fermentasi, dan *soft drink* yang mengandung aspartam yang merupakan sumber pembentukan metanol dalam tubuh manusia.

Metanol merupakan bahan berbahaya yang biasanya dijadikan bahan dalam pembuatan miras oplosan. Metanol jauh lebih berbahaya daripada etanol dan sangat berisiko terhadap kesehatan. Gejala keracunan metanol dapat berupa sakit kepala,

gangguan pada saluran cerna, gelisah, sesak nafas, penglihatan kabur hingga kebutaan (Darmono, 2009).

Metanol cepat diserap baik melalui oral, inhalasi maupun kulit. Reaksi metanol yang masuk ke dalam tubuh dapat segera terabsorpsi dan terdistribusi ke dalam cairan tubuh. Proses pemecahan metanol dalam tubuh terjadi di hati. Metabolisme metanol dapat terjadi dengan cara oksidasi metanol menjadi formaldehid kemudian menjadi asam format dan juga dapat langsung diekskresikan melalui urin atau dapat dilanjutkan dengan proses oksidasi yang merubah metanol menjadi karbon dioksida (Dorokhov *et al.*, 2015). Formaldehid bersifat toksik namun akibat proses metabolismenya yang cepat menjadi asam format sekitar 1-2 menit sehingga kadarnya hampir tidak pernah terdeteksi pada tubuh setelah keracunan metanol. Asam format dapat terdeteksi dalam tubuh bersamaan dengan terdeteksinya metanol dikarenakan waktu paruh metanol 24-68 jam. Asam format tidak dilakukan uji pemeriksaan dikarenakan asam format tidak hanya berasal dari metabolisme metanol. Pemeriksaan kadar metanol dalam urin lebih akurat karena kadar metanol dalam urin lebih stabil (Nisak, 2008).



Gambar 2.1 Metabolisme metanol dalam tubuh  
(Sumber: Dorokhov *et al.*, 2015)

### 2.3 Urin

Urin atau air seni atau air kencing adalah cairan sisa yang diekskresikan oleh ginjal yang kemudian akan dikeluarkan dari dalam tubuh melalui proses

urinalisasi. Ekskresi urin diperlukan untuk membuang molekul-molekul sisa dalam darah yang disaring oleh ginjal dan untuk menjaga homeostasis cairan tubuh. Dalam mempertahankan homeostasis tubuh peranan urin sangat penting, karena sebagian pembuangan cairan oleh tubuh adalah melalui sekresi urin.

Komposisi zat-zat dalam urin bervariasi tergantung jenis makanan serta air yang diminumnya. Urin normal berwarna jernih transparan, sedang warna urin kuning muda urin berasal dari zat warna empedu. Urin normal pada manusia terdiri dari air, urea, asam urat, amoniak, kreatinin, asam laktat, asam fosfat, asam sulfat, klorida, garam-garam terutama garam dapur, dan zat-zat yang berlebihan di dalam darah misalnya vitamin C dan obat-obatan. Semua cairan dan materi pembentuk urin tersebut berasal dari darah atau cairan interstisial. Komposisi urin berubah sepanjang proses reabsorpsi ketika molekul yang penting bagi tubuh, misal glukosa, diserap kembali ke dalam tubuh melalui molekul pembawa.

Urin berasal dari darah yang dibawa arteri renalis masuk ke dalam ginjal dengan melalui glomerulus berfungsi sebagai ultrafiltrasi pada simpai bowman, berfungsi untuk menampung hasil filtrasi dari glomerulus. Pada tubulus ginjal akan terjadi penyerapan kembali zat-zat yang sudah disaring pada glomerulus, sisa cairan akan diteruskan ke piala ginjal terus berlanjut ke ureter. Ada 3 tahap pembentukan urin yaitu:

1. Proses Filtrasi

Proses ini terjadi di glomerulus, proses filtrasi terjadi karena permukaan aferen lebih besar dari permukaan eferen sehingga terjadi penyerapan darah. Sedangkan sebagian yang tersaring adalah bagian cairan darah kecuali protein. Cairan yang tersaring ditampung oleh simpai bowman yang terdiri dari glukosa, air, natrium, klorida, sulfat, bikarbonat dan lain-lain, yang diteruskan ke tubulus ginjal.

2. Proses Reabsorpsi

Fungsi utama tubulus proksimal adalah reabsorpsi yaitu proses dikembalikannya air bersama dengan glukosa, asam amino, asam urat dan protein yang berhasil menembus filter glomerulus ke aliran darah. Tubulus proksimal juga mengembalikan elektrolit, natrium, klorida dan bikarbonat. Simpai henle mereabsorpsi air dan natrium. Tubulus distal secara halus

mengatur konsentrasi ion-ion natrium, kalium, bikarbonat, fosfat dan hidrogen.

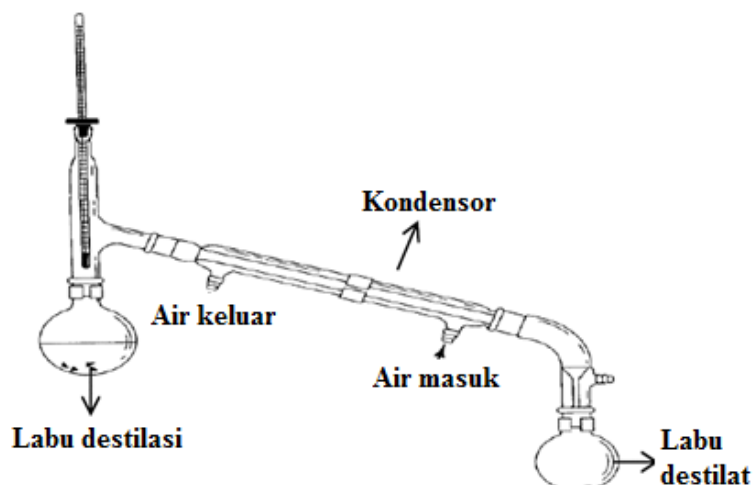
### 3. Proses Sekresi

Proses ini adalah proses penyerapan urin sisa dari filtrasi dan reabsorpsi. Proses penyerapan urin ini terjadi pada tubulus dan diteruskan ke piala ginjal selanjutnya diteruskan ke ureter masuk ke vesika urinaria.

Vazquez *et al.* (2010) telah melakukan penelitian dalam menentukan senyawa volatil dalam minuman beralkohol. Metode yang digunakan yaitu tanpa perlakuan preparasi yaitu dengan diinjeksikan langsung pada *Gas Chromatography* (GC). Metode ini sederhana dan dapat menentukan 33 senyawa volatil. Akan tetapi, metode ini tidak cocok jika diaplikasikan pada penentuan senyawa volatil dalam urin dikarenakan pengotor (*impurities*) dalam urin banyak sehingga diperlukan suatu perlakuan preparasi terlebih dahulu pada sampel urin seperti pengaturan pH dan sentrifugasi, guna menghilangkan kekeruhan. Metode preparasi metanol dapat menggunakan ekstraksi fase padat, *headspace equilibrium*, ekstraksi cair-cair dan distilasi (Wang *et al.*, 2004).

## 2.4 Distilasi

Distilasi adalah metode pemisahan kimia berdasarkan perbedaan titik didih cairan pada tekanan tertentu. Dalam distilasi, campuran zat dididihkan sehingga menguap dan uap didinginkan kembali dalam bentuk cairan yang disebut destilat. Pada pemisahan dengan cara distilasi semua komponen yang terdapat di dalam campuran bersifat mudah menguap (volatil). Tingkat penguapan (volatilitas) masing-masing komponen berbeda-beda pada suhu yang sama. Hal ini akan berakibat bahwa pada suhu tertentu uap yang dihasilkan dari suatu campuran cairan akan selalu mengandung lebih banyak komponen yang lebih volatil. Pada pemisahan metanol dalam urin, metanol akan menguap pada suhu titik didih metanol yaitu 64,5 °C.



Gambar 2.2 Skema diagram distilasi konvensional  
(Sumber: Kusuma *et al.*, 2016)

Minuman oplosan yang mengandung alkohol akan diekskresikan dalam bentuk cairan biologis seperti urin dan darah. Dikarenakan sifat alkohol yang bersifat volatil, urin diperlukan pemurnian untuk mendapatkan senyawa alkohol yang terkandung didalamnya. Sudhaker & Jain (2016) telah melakukan preparasi sampel pada urin dan darah dengan distilasi menggunakan pelarut air aquades dan penambahan asam tartrat sebagai agen deprotenasi. Penambahan asam tartrat berfungsi untuk menghilangkan zat-zat protein pada urin agar kadar pengotor dalam urin berkurang. Destilat yang didapatkan dari proses distilasi akan diukur kadarnya dan diketahui jenis alkohol yang terkandung pada minuman tersebut. Pengukuran kadar dan penentuan jenis alkohol dilakukan menggunakan instrumen *Gas Chromatography* (GC).

## 2.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi juga merupakan proses satu atau lebih komponen dari suatu campuran homogen menggunakan pelarut cair (*solvent*) sebagai *separating agent* pemisahan atas dasar kemampuan larut yang berbeda dari komponen-komponen dalam campuran. Ekstraksi pelarut atau sering disebut ekstraksi air merupakan metode pemisahan atau pengambilan zat terlarut dalam larutan (biasanya dalam air) dengan menggunakan pelarut lain (biasanya organik). Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu. Ada beberapa target ekstraksi, diantaranya (Mukhriani, 2014), yaitu:

1. Senyawa bioaktif yang tidak diketahui
2. Senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme
3. Sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural.

Pemisahan zat-zat terlarut antara dua cairan yang tidak saling bercampur antara lain menggunakan corong pisah. Jenis pemisahan lainnya dimana pada satu fase dapat berulang-ulang dikontakkan dengan fase yang lain, misalnya ekstraksi berulang-ulang suatu larutan dalam pelarut air dan pelarut organik dalam hal ini digunakan suatu alat yaitu ekstraktor soklet. Metode soklet ini merupakan metode ekstraksi dari padatan dengan pelarut air secara kontinu. Berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi, suatu ekstraksi dibedakan menjadi ekstraksi fase padat dan ekstraksi cair-cair.

#### 2.4.1 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair adalah suatu teknik dalam suatu larutan (biasanya dalam air) dengan suatu pelarut kedua (biasanya organik), yang tidak dapat saling bercampur dan menimbulkan perpindahan satu atau lebih zat terlarut (*solute*) kedalam fase yang kedua. Ekstraksi cair-cair sering juga disebut ekstraksi pelarut banyak dilakukan untuk memisahkan zat seperti iod atau logam-logam tertentu dalam air. Ekstraksi pelarut menyangkut distribusi solut diantara dua fasa cair yang tidak bercampur. Prinsip ini didasari hukum Nerst untuk distribusi pelarut yang tidak bercampur. Secara umum dikatakan ekstraksi adalah proses penarikan suatu komponen (zat terlarut) dari larutannya dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak bercampur dengan air. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu:

##### 1 Koefisien Distribusi ( $K_D$ )

Perbandingan konsentrasi solut didalam kedua pelarut tersebut tetap, dan merupakan suatu tetapan pada suhu tetap yang disebut koefisien distribusi.

$$K_D = \frac{C_{organik}}{C_{air}}$$

$K_D$  hanya berlaku bila: (a) solut tidak terionisasi dalam salah satu pelarut; (b) solut tidak berasosiasi dalam salah satu pelarut; dan (c) zat terlarut tidak bereaksi dengan salah satu pelarut, atau adanya reaksi-reaksi lain.



2 Angka banding distribusi (D)

Angka banding distribusi menyatakan perbandingan konsentrasi total zat terlarut dalam pelarut organik (fasa organik) dan pelarut air (fasa air).

$$D = \frac{\text{konsentrasi total senyawa X dalam fasa organik}}{\text{konsentrasi total senyawa X dalam fasa air}}$$

3 Persen terkestraksi (%E)

Persen terekstraksi adalah banyaknya mol zat yang terkestraksi dalam fasa organik dibagi dengan banyaknya mol total dalam fasa organik dan fasa air dikalikan 100.

$$\%E = \frac{\text{mol zat A dalam fasa organik}}{\text{mol zat A dalam fasa organik} + \text{mol zat A dalam fasa air}} \times 100$$

$$\%E = \frac{100D}{D + 1}$$

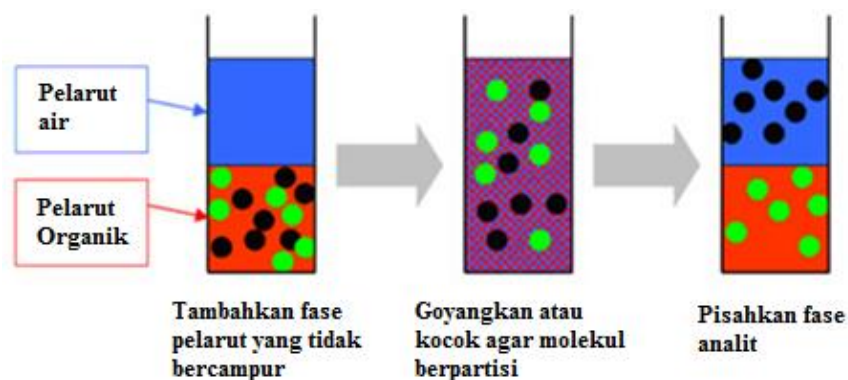
4 Selektifitas ekstraksi

Kemampuan untuk memisahkan dua solut tergantung pada besarnya angka banding distribusi relatif dari kedua solut dimana faktor pemisahan ( $\beta$ ) dapat didefinisikan  $D_A$  dan  $D_B$  dimana  $D_A > D_B$ . Tabel berikut memberikan gambaran derajat pemisahan dua solut berdasarkan nilai  $\beta$  nya, dengan kondisi percobaan satu kali ekstraksi, volume kedua fasa dibuat sama.

Tabel 2.1 Pemisahan dua solut dengan satu kali ekstraksi dan volume sama

$D_A$	$D_B$	$\beta$	% A terekstrak	% B terekstrak
	10	10	99,0	90,9
	1	$10^2$	99,0	50,0
$10^2$	$10^{-1}$	$10^3$	99,0	9,1
	$10^{-2}$	$10^4$	99,0	1,0
	$10^{-3}$	$10^5$	99,0	0,1

(Sumber: Soebagio *et al.*, 2005)



Gambar 2.3 Prinsip ekstraksi cair-cair  
(Sumber: Chambers *et al.*, 2013)

Prinsip dasar dari pemisahan ekstraksi cair-cair berdasarkan koefisien partisi dari analit pada kedua pelarut atau berdasarkan kelarutan analit pada kedua pelarut tersebut. Ketika sampel atau campuran pelarut telah bercampur, dua lapisan akan terbentuk dan salah satunya mengandung banyak komponen yang akan diekstraksi. Lapisan yang terbentuk dipisahkan kemudian salah satu lapisan yang mengandung komponen yang akan diambil dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* (Simpson, 2000). Ekstraksi analit dilakukan menggunakan pelarut yang sesuai, pemilihan pelarut harus dioptimalkan sesuai profil kelarutan analit dengan pertimbangan ekstraksi meminimalkan dari campuran kotoran endogen (Chambers *et al.*, 2013).

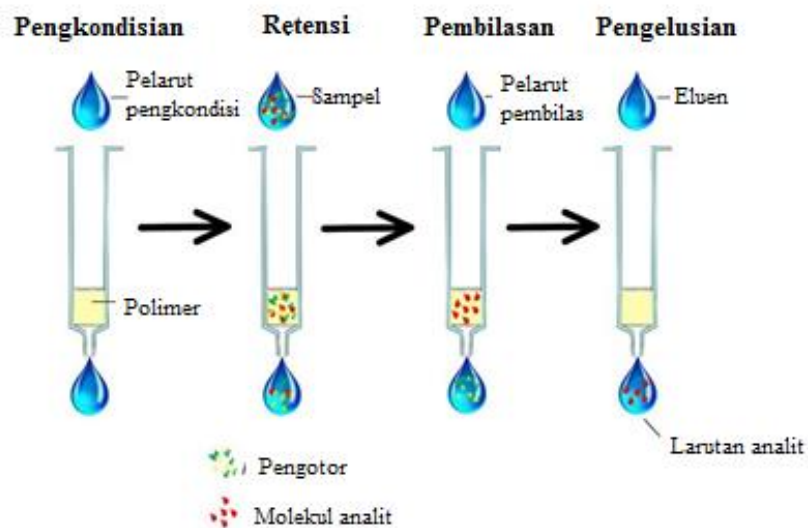
Hernanz *et al.*, (2008) telah melakukan penelitian penentuan metanol dengan preparasi menggunakan ekstraksi cair-cair. Penggunaan campuran pelarut dietil eter dan *n*-heptana memberikan hasil yang yang efektif dari pada pelarut diklorometana. Pemilihan pelarut yang tepat dalam ekstraksi diperlukan agar analit yang diinginkan dapat terekstrak sempurna tanpa pengotor.

#### 2.4.2 Ekstraksi Fase padat

*Solid Phase Extraction* (SPE) merupakan metode ekstraksi fase padat dimana analit dilewatkan pada kolom yang berisi adsorben fase padat (SPE, Si-Gel C-18, Extrelut, Bund Elut Certify, dan lain-lain) dan dielusi dengan pelarut tertentu, biasanya diikuti dengan modifikasi pH pelarut (Wirasuta, 2008). Keunggulan ekstraksi fase padat yaitu pemisahan analit dari matriks lebih efisien, volume pelarut ekstraksi yang digunakan kecil dan hanya memerlukan satu tahap. Untuk

meningkatkan sensitivitas dan selektivitas dalam analisis sampel, metode SPE dapat dikombinasi dengan metode lain seperti kromatografi.

Ekstraksi fase padat dapat dibagi menjadi 4 berdasarkan jenis fase diam atau penjerap yang dikemas dalam cartridge, yakni fase normal (*normal phase*), fase terbalik (*reversed phase*), adsorpsi (*adsorption*) dan pertukaran ion (*ion exchange*). Pemilihan penjerap didasarkan pada kemampuannya berikatan dengan analit, dimana ikatan antara analit dengan penjerap harus lebih kuat dibandingkan ikatan antara analit dengan matriks sampel sehingga analit akan tertahan pada penjerap. Selanjutnya dipilih pelarut yang mampu melepaskan ikatan antara analit dengan penjerap pada tahap elusi (Botsoglou & Fletouris, 2001).



Gambar 2.4 Proses ekstraksi fase padat  
(Sumber: Riofrio, 2016)

Adapun 4 langkah utama dalam penggunaan ekstraksi fase padat adalah seperti terlihat pada Gambar 2.4. Tahap pertama yaitu pengkondisian (*conditioning*), merupakan tahapan yang dilakukan dengan penambahan pelarut yang mampu mengaktifkan penjerap serta mampu membasahi permukaan penjerap sehingga analit yang terdapat dalam larutan sampel dapat berinteraksi dengan penjerap. Tahap kedua yaitu retensi (*retention/loading*) merupakan proses pemasukan larutan sampel, dimana pada proses ini analit yang diinginkan akan tertahan pada penjerap sementara komponen lain dari matriks yang tidak diinginkan akan keluar dari cartridge. Tahap ketiga dilanjutkan dengan pembilasan (*washing*) yang dilakukan dengan penambahan larutan yang mampu menghilangkan sisa

matriks yang tertinggal tetapi tidak mempengaruhi interaksi analit dengan penjerap. Tahap terakhir yaitu pengelusan (*elutioning*) yang dilakukan dengan penambahan larutan yang mampu memutuskan ikatan analit dengan penjerap.

Lopez *et al.* (2002) telah melakukan penelitian terhadap penentuan senyawa volatil pada minuman beralkohol menggunakan metode preparasi ekstraksi fase padat. Sorben Lichrolut-EN resins memiliki kemampuan yang baik dalam ekstraksi pada minuman beralkohol, akan tetapi harganya yang cukup mahal. Sorben yang dapat digunakan dalam ekstraksi senyawa volatil yaitu florisil® dikarenakan memiliki kemampuan adsorpsi yang bagus berdasarkan interaksi semipolar. Penggunaan diklorometana dipilih sebagai eluen dalam pekerjaan ini karena telah terbukti menjadi pelarut yang paling efisien untuk ekstraksi senyawa volatil dari minuman beralkohol dalam banyak kasus (Lukic *et al.*, 2006).

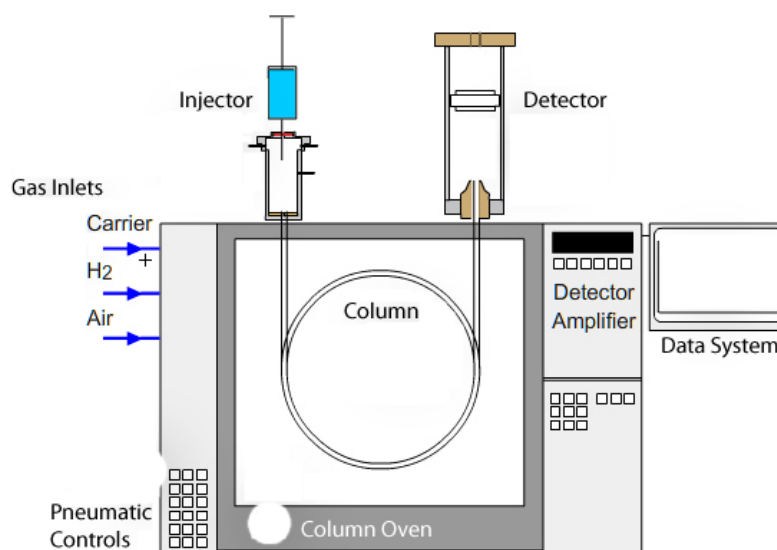
Permasalahan yang sering muncul adalah ketika ada sampel yang komposisinya tidak diketahui namun bersifat sangat kompleks dan mengandung begitu banyak komponen kimia berbentuk cairan dan terdapatnya partikel padat yang mengembang didalamnya. Pemilihan metode ekstraksi ditentukan oleh analisis senyawa spesifik yang terdapat didalam suatu sampel tersebut. Perolehan kembali yang tinggi pada ekstraksi adalah sangat penting untuk mencari semua analit, sedangkan selektifitas yang tinggi diperlukan untuk menjamin pengotor atau senyawa pengganggu terpisahkan dari analit.

## **2.6 Gas Chromatography**

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen – komponen dalam fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa cairan atau gas, sedangkan fasa diam dapat berupa padatan atau cairan. Jika fasa geraknya berupa cairan, maka disebut kromatografi cairan (*Liquid Chromatography*) dan jika fasa gerak berupa gas, maka disebut kromatografi gas (*Gas Chromatography*) (McNair & Miller, 2009).

Dasar pemisahan dengan metode *Gas Chromatography* (GC) adalah berdasarkan perbedaan koefisien partisi dari senyawa yang diuapkan antara fase cair dan fase gas yang dilewatkan dalam kolom dengan bantuan gas pembawa. Ketika senyawa meninggalkan kolom, senyawa akan melewati suatu detektor yang dihubungkan dengan suatu amplifier dan menuju alat pencatat yang akan mencatat

puncak–puncak senyawa yang dilewati detektor. Gas pembawa (fase gerak) dalam kromatografi gas dapat menggunakan gas nitrogen, helium atau argon (Bintang, 2010). Sedangkan fase diam didasarkan pada prinsip “like dissolve like” dimana fase diam yang bersifat polar akan berinteraksi dengan senyawa polar dan sebaliknya sehingga terdapat tiga jenis kolom dengan perbedaan sifat polaritas fase diamnya. Kolom HP1 bersifat nonpolar, HP5 bersifat semipolar, dan kolom HP *innowax* bersifat polar.



Gambar 2.5 Bagian-bagian alat *gas chromatography*  
(Sumber: Pontes *et al.*, 2009)

*Gas Chromatography* (GC) memiliki komponen utama berupa gas pembawa, injector, oven, kolom, detektor, dan recorder. Bintang (2010) menjelaskan dalam kromatografi gas sistem detektor yang umum digunakan adalah detektor ionisasi nyala atau *Flame Ionization Detector* (FID). *Flame Ionization Detector* (FID) adalah detektor yang memiliki sensitivitas tinggi yaitu 0,02 coulomb per gram dari hidrokarbon (Dean, 1995). Detektor ionisasi nyala dapat digunakan hampir untuk semua senyawa organik sampai batas rendah satu nanogram, dan respon linier yang terluas berkisar  $10^6$ . FID memiliki kemampuan detektor terkecil  $5 \times 10^{-12}$  g/detik dan suhu tertinggi  $400^\circ\text{C}$ . Dalam hal memperoleh tanggapan detektor ionisasi nyala yang optimal sebaiknya kecepatan aliran  $\text{H}_2 \pm 30$  mL/menit dan  $\text{O}_2$  sepuluh kalinya (Gandjar & Rohman, 2014). GC-FID merupakan metode yang sangat sensitif, cepat, dan dapat diandalkan untuk menentukan sejumlah besar senyawa volatil di berbagai sampel biologis (Pontes *et al.*, 2009).

Kromatogram merupakan kurva yang diperoleh dari pengukuran kromatografi. Kromatogram terdiri dari sejumlah puncak yang menunjukkan jumlah komponen yang terdapat dalam cuplikan, sedangkan luas puncak menunjukkan konsentrasi komponen dalam cuplikan.

Metode analisis yang akurat digunakan di laboratorium untuk pengujian etanol dalam urin pada penyalahgunaan minuman beralkohol umumnya menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Metode ini spesifik untuk identifikasi dan penentuan kadar etanol serta dapat digunakan untuk pemisahan campuran alkohol seperti metanol dan isopropanol secara simultan (Hendrayana, 2006). Suaniti *et al.* (2012) telah melakukan penelitian terhadap kadar etanol dalam urin menggunakan GC. Kondisi analisis yang dipergunakan yaitu suhu injektor 250 °C, suhu detektor 300 °C, dengan split rasio 20. Suhu awal kolom 50 °C ditahan dua menit pada suhu tersebut, ditingkatkan secara bertahap sebesar 10 °C/menit sampai suhu mencapai 220 °C dan ditahan selama lima menit. Laju alir dari kolom yang terpilih adalah 0,7 mL/menit. Laju alir gas helium 40 mL/menit, laju alir nitrogen 50 mL/menit dan laju udara sebagai pengoksida 450 mL/menit.

## **2.7 Validasi**

Validasi adalah konfirmasi melalui bukti-bukti pemeriksaan dan telah sesuai dengan tujuan pengujian. Validasi harus dilakukan terhadap metode non-standar dan metode yang dikembangkan laboratorium. Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya. Validasi biasanya diperuntukkan untuk metode analisa yang baru dibuat dan dikembangkan. Metode kuantitatif untuk pengujian validasi mengandung beberapa parameter yang ditentukan yaitu:

### **2.7.1 Uji Linearitas**

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk mendapatkan hasil yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran yang ada. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan standar dalam mendeteksi analit dalam contoh. Linearitas biasanya dinyatakan dengan istilah variansi disekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematis data yang diperoleh dari hasil pengukuran analit dalam sampel dengan berbagai

konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil (*least square method*) antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Linearitas metode dapat menggambarkan ketelitian pengerjaan analisis suatu metode yang ditunjukkan oleh nilai koefisien determinasi.

Parameter hubungan kelinieran yang digunakan yaitu koefisien korelasi ( $r$ ) dan koefisien determinasi ( $R$ ) pada analisis regresi linier  $y = bx + a$  ( $b$  adalah slope,  $a$  adalah intersep,  $x$  adalah konsentrasi analit dan  $y$  adalah respon instrumen). Linearitas metode dapat menggambarkan ketelitian pengerjaan analisis suatu metode yang ditunjukkan oleh nilai koefisien determinasi sebesar  $>0,997$  (Handayani & Lestari, 2012).

### 2.7.2 Uji *Limit of Detection* (LoD)

*Limit of Detection* atau limit dereksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blangko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blangko (Hidayati, 2014).

Harmita (2004) menyatakan bahwa untuk penentuan limit deteksi dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) dengan rumus:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$LoD = \frac{3 \times SD}{b}$$

#### Keterangan

- $x$  : Nilai data pengukuran
- $\bar{x}$  : Rata rata pengukuran
- $b$  : slope
- $n$  : Jumlah ulangan
- SD : *Standar Deviation*
- LoD : Limit deteksi

### 2.7.3 Uji *Limit of Quantitation* (LoQ)

*Limit of Quantitation* (LoQ) adalah parameter yang menunjukkan jumlah terkecil dari analit yang terkandung dalam sampel yang dapat dikuantifikasi secara presisi dan akurat (Hidayati, 2014). Parameter ini digunakan untuk pengujian kuantitatif analit dengan jumlah kecil yang terkandung dalam sampel dan digunakan untuk pengukuran cemaran serta produk degradasi.

Harmita (2004) menyatakan bahwa untuk penentuan limit deteksi dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) dengan rumus:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$LoQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

Keterangan

- $x$  : Nilai data pengukuran
- $\bar{x}$  : Rata rata pengukuran
- $b$  : slope
- $n$  : Jumlah ulangan
- SD : *Standar Deviation*
- LoQ : Limit kuantitasi

### 2.7.4 Uji Akurasi

*Accuracy* atau akurasi adalah derajat ketepatan antara nilai yang diukur dengan nilai sebenarnya yang diterima. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi adalah suatu kedekatan kesesuaian antara hasil suatu pengukuran dan nilai benar dari kuantitas yang diukur atau suatu pengukuran posisi yaitu seberapa dekat pengukuran terhadap nilai benar yang diperkirakan (Hidayati, 2014).

Ada tiga macam metode yang dapat dilakukan untuk uji akurasi, antara lain:

- a. Material standar dilakukan dengan membandingkan hasil akurasi analisis uji terhadap cuplikan acuan standar atau *Standard Reference Material* (Sukirno & Murniasih, 2008).
- b. Metode baku dilakukan dengan membandingkan hasil analisis analit dengan metode yang divalidasi terhadap hasil dengan metode standar.



- c. Perolehan kembali (*recovery*) dilakukan dengan menambahkan sejumlah kadar analit yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam matriks sampel yang akan dianalisis.

Uji perolehan kembali (*recovery*) lebih sering digunakan dibanding dengan material standar dan metode baku, karena uji *recovery* lebih mudah dilakukan dan dengan biaya yang lebih murah. Uji perolehan kembali dilakukan untuk mengukur ketepatan hasil dari analisis yang telah dilakukan. Dicoba dua perlakuan yang diambil dari satu contoh atau contoh yang sama, masing-masing satu untuk contoh yang ditambahkan standar dan satu lagi untuk larutan blangko (contoh tanpa penambahan larutan standar). Uji akurasi dapat diukur dengan menentukan presentase perolehan kembali (% *recovery*) dari analit yang ditambahkan ke dalam contoh. Suatu metode dikatakan valid apabila nilai presentase *recovery* dari suatu standar antara 90-110% (Sumardi, 2002). Namun jika komponen yang dianalisis merupakan *trace analysis* maka presentase *recovery* yang disyaratkan adalah 100%  $\pm 20$ .

$$\% Recovery = \frac{Konsentrasi\ terukur}{Konsentrasi\ teoritis} \times 100 \%$$

Tabel 2. 2 Penentuan batasan awal %*Recovery*

Analit pada matriks sampel	<i>Recovery</i> yang diterima (%)
10 < A ≤ 100 (%)	98-101
1 < A ≤ 10 (%)	95-102
0,1 < A ≤ 1 (%)	92-105
0,01 < A ≤ 0,1 (%)	90-108
10 ppm < A ≤ 0,01%	85-110
1 < A ≤ 10 (ppm)	80-115
10 ppb < A ≤ 1 ppm	75-120
1 < A ≤ 10 (ppb)	70-125

(Sumber: Sudariyono *et al.*, 2009)

### 2.7.5 Uji Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan kedekatan antara nilai hasil pengukuran dari sampel yang homogen pada kondisi normal (sampel yang sama diuji secara berurutan dengan menggunakan alat yang sama). Presisi dipengaruhi oleh kesalahan acak (*random error*), antara lain ketidakstabilan instrumen, variasi suhu atau pereaksi, keragaman teknik dan operator yang berbeda. Presisi dapat dinyatakan dengan berbagai cara antara lain dengan simpangan baku, simpangan

rata-rata atau kisaran yang merupakan selisih hasil pengukuran yang terbesar dan terkecil (Hidayat, 1989).

Menurut Sumardi (2002), presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*), ketertiruan (*reproducibility*) dan presisi antara (*intermediate precision*). Parameter presisi tersebut antara lain:

1. Keterulangan (*Repeatability*)

Keterulangan adalah ketelitian yang diperoleh dari hasil pengulangan dengan menggunakan metode, operator, peralatan, laboratorium, dan dalam interval pemeriksaan waktu yang singkat. Pemeriksaan keterulangan bertujuan untuk mengetahui konsistensi analit, tingkat kesulitan metode dan kesesuaian metode.

2. Presisi Antara (*Intermediate Precision*)

Presisi antara merupakan bagian dari presisi yang dilakukan dengan cara mengulang pemeriksaan terhadap contoh uji dengan alat, waktu, analisis yang berbeda, namun dalam laboratorium yang sama.

3. Ketertiruan (*Reproducibility*)

Ketertiruan yaitu ketelitian yang dihitung dari hasil penetapan ulangan dengan menggunakan metode yang sama, namun dilakukan oleh analisis, peralatan, laboratorium dan waktu yang berbeda.

Presisi dinyatakan sebagai presentase *Relative Standard Deviation* (%RSD) dari suatu seri pengukuran (Sumardi, 2002).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan

$x$  : Nilai data pengukuran

$\bar{x}$  : Rata rata pengukuran

$N$  : Jumlah ulangan

SD : *Standar Deviation*

RSD : *Relatif Standar Deviation*

RSD menunjukkan ketelitian dari metode uji :

$RSD \leq 1\%$  (sangat teliti)

$1\% < RSD \leq 2\%$  (teliti)

$2\% < RSD \leq 5\%$  (ketelitian sedang)

$RSD > 5\%$  (tidak teliti)

Namun jika komponen yang dianalisis merupakan *trace analysis* maka presentase RSD yang disyaratkan adalah  $0\% \pm 20$ . Dengan artian bahwa pada kisaran  $0\% \pm 20$  metode uji tergolong teliti.

## 2.8 Penelitian Terkait

Minuman tradisional beralkohol merupakan minuman yang mengandung etanol dan terbuat dari hasil fermentasi bahan-bahan pertanian. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk menganalisis kadar etanol pada minuman beralkohol. Lestari (2015) telah menganalisis pengaruh penambahan susu, madu, minuman bersoda, dan minuman berenergi terhadap kadar alkohol pada minuman keras. Penentuan kadar alkohol dengan menggunakan piknometer dengan melihat tabel hubungan berat jenis dengan kadar alkohol. Pada penelitian tersebut, penambahan susu, madu, minuman bersoda dan minuman berenergi dapat menurunkan kadar alkohol sekitar 3,53-14,45%. Kadar alkohol dalam minuman oplosan cenderung menurun, namun mencampur minuman keras dengan bahan lain tetap berbahaya karena dapat menyebabkan kematian. Minuman oplosan biasanya mengandung metil alkohol atau metanol.

Metanol merupakan alkohol beracun yang mematikan dan biasanya digunakan sebagai pelarut organik pada berbagai penelitian kimia. Li *et al.* (2007) telah berhasil menggunakan metode *full evaporation Headspace Gas Chromatography* (HS-GC) untuk menentukan metanol dalam minuman keras hitam. Penggunaan volume sampel yang kecil (<30 uL) dan temperatur tinggi (105 °C), hampir semua massa metanol mengalami transfer massa ke fase uap dalam waktu dua menit. Arslan *et al.* (2015) telah melakukan analisis metanol pada produk minuman beralkohol ilegal menggunakan GC-MS. Sebanyak 39 (75%) sampel terdeteksi metanol dan didapatkan nilai LOD metanol sebesar 0,79 ng/mL.

Metabolisme alkohol dalam tubuh secara langsung dapat diserap melalui tubuh dan dapat ditemukan dalam materi biologis seperti urin dan darah. Suaniti *et*

*al.* (2012) telah menganalisis kadar etanol dalam sampel urin menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Pada penelitian tersebut urin yang telah mengkonsumsi arak dideteksi dengan GC-FID menggunakan standar internal butanol dan didapatkan sampel urin hanya mengandung etanol dengan kadar yang berbeda-beda. Bueno *et al.* (2014) menggunakan cairan oral sebagai matriks untuk menentukan etanol dengan dibandingkan pada sampel urin. Preparasi sampel untuk mengekstrak etanol menggunakan teknik headspace dan dianalisis dengan *Gas Chromatography* (GC) dengan deteksi ionisasi nyala.

Metode analisis yang akurat untuk pengujian alkohol dalam urin pada penyalahgunaan minuman beralkohol umumnya menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Jones & Kugelberg (2010) dan Tiscione *et al.* (2011) telah menganalisis kuantitatif etanol pada sampel darah dan urin menggunakan HS-GC-FID. Sudhaker & Jain (2016) telah menganalisis efek penggunaan standar internal *n*-propanol dalam penentuan etanol. Penggunaan *n*-propanol sebagai standar internal sangat tepat dikarenakan memiliki sifat karakteristik yang hampir mirip dengan analit namun tidak bereaksi dengan analit serta memiliki puncak yang dekat dengan analit namun dapat dipisahkan.

## **BAB 5**

### **SIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Simpulan**

Berdasarkan penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, didapat simpulan sebagai berikut:

1. Berdasarkan ketiga metode preparasi yang berbeda, metode preparasi yang paling tepat terhadap penentuan kuantitatif metanol dalam urin yang diuji dengan *Gas Chromatography* (GC) adalah metode distilasi dengan hasil validitas uji akurasi yang dinyatakan dalam persentase *recovery* sebesar 95,56% dan uji presisi yang dinyatakan dalam %RSD sebesar 2,03% terhadap destilat.
2. Metode distilasi merupakan metode yang valid dibandingkan dengan metode ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat dikarenakan proses distilasi merupakan sistem tertutup sehingga meminimalisir hilangnya metanol selama proses preparasi yang dilakukan.

#### **5.2. Saran**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut sebagai berikut:

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut terkait *Limit of Detection* (LoD) dan *Limit of Quantitation* (LoQ) pada metode preparasi distilasi, ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat.
2. Dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pelarut yang optimal dalam penentuan metanol dalam urin pada metode preparasi ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat.
3. Dilakukan penelitian lebih lanjut tentang adsorben yang optimal dalam penentuan metanol dalam urin pada metode ekstraksi fase padat.
4. Dilakukan penelitian lebih lanjut dengan memodifikasi metode preparasi menggunakan metode *headspace*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, A. 2018. Penetapan Kadar Metanol dan Etanol dalam Minuman Beralkohol dengan Kromatografi Gas di Badan Reserse Kriminal Polri Pusat Laboratorium Forensik. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia.
- Aradea, A. 2014. *Your Reliable Partner for Accredited Lab*. Semarang. PT Merck Tbk.
- Arslan, M. M., C. Zeren, Z. Aydin, R. Akcan, R. Dokuyucu, A. Keten, & N. Cekin. 2015. Analysis of Methanol and Its Derivatives in Illegally Produced Alcoholic Beverages. *Journal of Forensic and Legal Medicine*.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga
- Botsoglou, N. A. & D. J. Fletouris. 2001. *Drug Residues in Foods Pharmacology, Food Safety, and Analysis*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Bueno, L. H. P., R. H. A. D. Silva, A. V. Azenha, M. C. D. S. Dias, & B. S. D. Martinis. 2014. Oral fluid as an Alternative Matrix to Determine Ethanol for Forensic Purposes. *Forensic Science International*, 242: 117–122.
- Chambers A.G., J. P. Andrew, Y. Juncong, G. C. Alexander, & H. B. Christoph. 2013. Multiplexed Quantitation of Endogenous Proteins in Dried Blood Spots by Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 12(3): 781–791.
- Darmono. 2009. *Toksikologi Narkoba dan Alkohol*. Jakarta: UIP.
- Dean, J. A. 1995. *Analytical Chemistry Handbook*. United States of America: McGraw-Hill, Inc.
- Dorokhov, Y. L., V. Anastasia, E. V. Shindyapina, Sheshukova, & V. K. Tatiana. 2015. Metabolic Methanol: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol Rev*, 95: 603-644. Tersedia di <http://physrev.physiology.org> [diakses 22-11-2017].
- Gandjar, I. G. & A. Rohman. 2014. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Ghorbani, H., A. Nezami, B. Sheikholeslami, A. Hedjazi1, & M. Ahmadimanesh. 2018. Simultaneous Measurement of Formic Acid, Methanol and Ethanol in Vitreous and Blood Samples of Postmortem by Headspace GC-FID. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 13(1): 1-8.
- Hamidah, M. & K. Yulianti. 2017. Temuan Post Mortem Akibat Keracunan Metanol. *E-Jurnal Medika*, 6(7): 1-7.
- Handayani, H. N. & N. O. Lestari. 2012. Isolasi Metamfetamina di Dalam Urin dengan Menggunakan Solid Phase Extraction (SPE). *Tugas Akhir*. Bandung: Politeknik Negeri Bandung.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Jurnal Majalah*, 1(3): 117-135.
- Hendrayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hernanz, D., V. Gallo, A. F. Recamales, A. J. M. Martines, & F. J. Heredia. 2008. Comparison of the Effectiveness of Solid-Phase and Ultrasound-Mediated Liquid-Liquid Extractions to Determine the Volatile Compounds of Wine. *Talanta*, 76: 929-935.

- Hidayat, A. 1989. *Pengendalian dan Evaluasi Unjuk Kerja Metode Analisis Kimia*. Pusat Pembinaan Latihan Keterampilan dan Kejuruan Industri: Warta AKAB.
- Hidayati, E N., M. Alauhdin, & A.T. Prasetya. 2014. Perbandingan Metode Destruksi Pada Analisis Pb dalam Rambut dengan AAS. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 3(1): 36-41.
- Jones, A. W. & F. C. Kugelberg. 2010. Relationship between Blood and Urin Alcohol Concentrations in Apprehended Drivers who Claimed Consumption of Alcohol after Driving with and without Supporting Evidence. *Forensic Science International*, 194: 97–102.
- Kusuma, H. S., A. F. P. Putra, & M. Mahfud. 2016. Comparison of Two Isolation Methods for Essential Oils from Orange Peel (*Citrus auranticum* L) as a Growth Promoter for Fish: Microwave Steam Distillation and Conventional Steam Distillation. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 7(2): 1-5.
- Lestari, I. 2015. Pengaruh Penambahan Susu, Madu, Minuman Bersoda dan Minuman Energi Terhadap Kadar Alkohol pada Minuman Keras. *Jurnal Kesehatan Prima*, 9(1): 1383-1390.
- Li, H., H. Zhan, S. Fu, M. Liu, & X. S. Chai. 2007. Rapid Determination of Methanol in Black Liquors by Full Evaporation Headspace Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1175: 133–136.
- Lopez, R., M. Aznar, J. Cacho, & V. Ferreira. 2002. Determination of Minor and Trace Volatile Compounds in Wine by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection. *Journal of Chromatography A*, 966: 167-177.
- Lukic, I., M. Banovic, D. Persuric, S. Radeka, & B. Sladonja. 2006. Determination of Volatile Compounds in Grape Distillates by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1101: 238-244.
- Maleki, R., K. Farhadi, & A. B. Matin. 2006. Analysis of Ethanol and Methanol in Human Body Fluids by Headspace Solid Phase Microextraction Coupled with Capillary Gas Chromatography. *Analytical Sciences*, 22: 1253-1255.
- Martinelli, M., A. A. r. Alves, T. M. Uekane, A. H. Oliveira, R. S. Campos, C. M, Rezende, & M. J. O. Fonesca. 2013. Analysis oVolatile Compounds in Fuyu Persimmon: Comparison of Extraction Techniques by GC-qMS, *Prosiding 15<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Extraction Technologies*. Brasil: Rio de Janeiro.
- McNair, H. M. & M. Miller. 2009. *Basic Gas Chromatography* (2<sup>nd</sup> ed). United States of America: A John Wiley & Sons, Inc.
- Mergen, G., Z. Kayalt, E. Dural, V. Aliyev, S. Kaya, S. Yalcin, A. Karaku, & T. Soylemezolu. 2010. Simultaneous Headspace-GC-FID Analysis for Methanol and Ethanol in Blood, Saliva, and Urine: Validation of Method and Comparison of Specimens. *Chromatography Online*, 1: 1-5.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2): 361-367.
- Muna, E. D. M., C. H. B. Bizarri, J. R. M. Maciel, G. P. Rocha, & I. O. Araujo. 2013. Method Validation for Methanol Quantification Present in Working Places. *Journal of Physics*, 1: 1-8.

- Nisak, N. 2008. Penentuan Kadar Alkohol dalam Urin dengan Kromatografi Gas. *Skripsi*. Bukit Jimbaran: FMIPA Universitas Udayana.
- Peraturan Presiden Republik Indonesia Nomor 74 Tahun 2013 tentang Pengendalian dan Pengawasan Minuman Beralkohol.
- Pizarro, C., C. S. Gonzales, N. P. D. Notario, & J. M. G. Saiz. 2011. Development of a Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for The Simultaneous Determination of The Main Compounds Causing Cork Taint and Brett Character in Wines Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218: 1576-1584.
- Pontes, H., P. G. D. Pinho, S. Casal, H. Carmo, A. Santos, T. Magalhaes, F. Remiao, F. Carvalho, & M. L. Bastos. 2009. GC Determination of Acetone, Acetaldehyde, Ethanol, and Methanol in Biological Matrices and Cell Culture. *Journal of Chromatographic Science*, 47: 272-278.
- Puslabfor Bareskrim Polri. 2017. *Instruksi Kerja Laboratorium Forensik Cabang Semarang*. Semarang: Labforcab Semarang.
- Riofrio, M. A. S. 2016. Extraction of Phorbol Esters (Pes) From Pinion Cake Using Computationally-Designed Polymers as Adsorbents for Solid Phase Extraction. *Tesis*. University of Leicester.
- Simpson, N. J. K. 2000. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. New York: CRC Press.
- Soebagio, E. Budiasih, M. S. Ibnu, H. R. Widarti, & Munzil. 2005. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.
- Suaniti, N. M. & N. P. Widya. 2011. Ethanol Levels in Arak Market by Gas Chromatography Techniques, *Prosiding International Conference on Chemistry and Biochemistry*. Bali: Universitas Udayana.
- Suaniti, N., I. Asih, & N. Astuti. 2012. Deteksi Etanol setelah Konsumsi Arak dalam Urin dengan Gas Chromatography. *Jurnal Kimia*, 6(2): 123-126.
- Sudariyono, S. T. Arundhati, A. Hadi, N. Rachmaniah, A. Saladini, S. Lahtiani, M. S. Belgentie, & D. Suyono. 2009. *Pedoman Pengendalian Mutu Internal Pengujian Parameter Kualitas Lingkungan*. Jakarta: Kementerian Negara Lingkungan Hidup.
- Sudhaker, S. & R. Jain. 2016. Effect of Using Propanol as Internal Standard on Quantitative Determination of Ethanol in Different Biological Matrices by Head Space-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. *Madridge Journal of Analytical Sciences and Instrumentation*, 1(1): 1-3.
- Sukirno & S. Murniasih. 2009. Analisis Unsur Fe, Ca, Ti, Ba, Ce, Zr dan La dalam Sedimen Laut di Semenanjung Muria dengan Metode XRF. *Prosiding Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan*. Jakarta: LIPI.
- Sumardi. 2002. Validasi Metode Pengujian. Makalah disampaikan pada pelatihan asesor laboratorium penguji. Jakarta: Pusat Standarisasi dan Akreditasi Sekretariat Jenderal Departemen Pertanian.
- Tiscione, N. B., I. Alford, D. T. Yeatman, & X. Shan. 2011. Ethanol Analysis by Headspace Gas Chromatography with Simultaneous Flame-Ionization and Mass Spectrometry Detection. *Journal of Analytical Toxicology*, 35: 501-511.
- Vazquez, C. L., M. H. Bollain, K. Berstsch, & I. Orriols. 2010. Fast Determination of Principal Volatile Compounds in Distilled Spirits. *Food Control*, 21: 1436-1441.



- Wang, M. L., J. T. Wang, & Y. M. Choong. 2004. A Rapid and Accurate Method for Determination of Methanol in Alcoholic Beverage by Direct Injection Capillary Gas Chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17: 187–196.
- Widyanti, E. M. 2010. Produksi Asam Sitrat dari Substrat Molase pada Pengaruh Penambahan VCO (Virgin Coconut Oil) Terhadap Produktivitas *Aspergillus Niger* Ltbcc L74 Terimobilisasi. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Wirasuta, M. A. G. 2008. Analisis Toksikologi Forensik dan Interpretasi Temuan Analisis. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*, 1(1): 47-55.
- Yeliana & I. K. G. Wirawan. 2005. Arak Bali sebagai Bahan Bakar Alternatif. *Jurnal Jurusan Teknik Mesin Fakultas Teknik Universitas Udayana Bukit Jimbaran*.
- Zuba, D., A. Parczewski, & M. Reichenbacher. 2002. Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Gas Chromatographic Determination of Ethanol and Other Volatile Compounds in Blood. *Journal of Chromatography B*, 773:75–82.