



Optimasi Penentuan Kadar Metanol dalam Darah Menggunakan *Gas Chromatography*

Hartias Rizalina^{1✉}, Edy Cahyono¹, Sri Mursiti¹, Bowo Nurcahyo², dan Supartono¹

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang Gedung D6 Kampus Sekaran Gunungpati Telp. (024) 8508112 Semarang 50229

²Laboratorium Forensik POLRI Cabang Semarang Kompleks AKPOL Jl. Sultan Agung, Candi Baru, Telp (024) 8312742 Semarang 50232

Info Artikel

Diterima Agustus 2018

Disetujui Oktober 2018

Dipublikasikan November 2018

Keywords:

metanol
darah
uji validitas
GC-FID

Abstrak

Pemeriksaan keracunan metanol di dalam tubuh dalam dunia forensik perlu dilakukan dengan preparasi yang cepat, tepat dan akurat karena umumnya sampel yang didapatkan jumlahnya terbatas. Penentuan metanol di dalam tubuh seperti darah dapat dianalisis menggunakan *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* (GC-FID), sebelum dianalisis sampel darah perlu dipreparasi untuk menghilangkan pengotor, oleh karena itu pemilihan metode preparasi yang cepat dan tepat perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui preparasi yang paling tepat, cepat, dan akurat, dengan mengkaji berbagai jenis metode preparasi sampel yaitu metode distilasi, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat. Uji validitas dilakukan untuk membuktikan keandalan suatu prosedur yang digunakan berdasarkan uji linearitas, LoD, LoQ, akurasi, dan presisi. Berdasarkan hasil analisis uji validitas disimpulkan bahwa akurasi dan presisi dari metode distilasi lebih baik dibandingkan metode ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat. Oleh karena itu metode distilasi lebih tepat digunakan untuk menentukan kadar metanol dalam darah menggunakan GC-FID.

Abstract

Examination of methanol poisoning in the body in the forensic world needs to be done with an appropriate, fast and accurate preparation since the amount of samples commonly obtained are very limited. Determination of methanol in the body such as blood can be analyzed using *Gas Chromatography-Flame Ionization Detector* (GC-FID), before analyzing blood samples need to be prepared to remove impurities, therefore the selection of a fast and precise preparation method needs to be done. This study aims to determine the most appropriate, fast, and accurate preparation, various types of sample preparation methods are examined in achieving those objectives, namely distillation method, liquid-liquid extraction, and solid phase extraction. Validity test is done to prove the reliability of a procedure which is used based on linearity, LoD, LoQ, accuracy, and precision tests. Based on the analysis result of validity test shows that the accuracy and precision of the distillation method is better than liquid-liquid extraction and solid phase extraction methods. Therefore, the distillation method is more appropriate to be used for determining the level of methanol in the blood using GC-FID.

© 2018 Universitas Negeri Semarang

✉Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lantai 2 Kampus Sekaran, Gunungpati, Semarang 50229
E-mail: rizalinatias@gmail.com

Pendahuluan

Minuman beralkohol atau dalam masyarakat biasa disebut minuman keras, akhir-akhir ini menjadi topik yang hangat diperbincangkan. Masyarakat di beberapa wilayah Indonesia banyak mengkonsumsi minuman beralkohol yang dicampur atau biasa disebut dengan miras oplosan. Minuman beralkohol yang sering dijumpai di Indonesia yaitu ciu, arak, tuak, dan lapen. Minuman keras tradisional tersebut sering dioplos dengan metanol maupun dengan obat herbal, sehingga tidak diketahui kadar yang ditambahkan dalam minuman tersebut (Hamidah & Yulianti, 2017). Minuman beralkohol tradisional lebih berbahaya dibandingkan dengan minuman beralkohol biasa. Bahan-bahan tersebut dicampurkan untuk mendapatkan efek alkohol yang lebih meningkat. Efek dari minuman beralkohol dapat ditentukan dengan jumlah kadar alkohol yang terdapat dalam darah (*Blood Alcohol Contain/BAC*) (Lestari, 2015).

Metanol adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3OH (Hikmah dan Zuliyana, 2010). Metanol relatif memiliki toksisitas rendah. Efek toksik muncul akibat hasil metabolisme metanol di hati yaitu asam format yang bersifat toksik. Metanol diubah menjadi formaldehid di hati oleh enzim alkohol dehidrogenase. Formaldehid dioksidasi oleh bantuan enzim formaldehid dehidrogenase menjadi asam format. Metabolisme asam format tergantung pada kadar tetrahidrofolat yang akan membentuk *10-formyl tetrahydrofolate* yang dapat mengubah asam format menjadi karbon dioksida (CO_2) dan air (H_2O) (Shindyapina *et al.*, 2014).

Matriks biologi yang sering digunakan untuk menganalisis kadar obat atau senyawa lain adalah serum, urine, darah, dan saliva. Matriks biologi (terutama darah) diperoleh dengan cara invasif melalui vena (*Venipuncture*) (Evans *et al.*, 2015). Distilasi adalah teknik yang sering digunakan dalam memisahkan cairan dalam campuran biner. Prinsip pada distilasi biasa yaitu pemisahan dua zat atau lebih yang mempunyai perbedaan titik didih. Suatu zat yang memiliki titik didih rendah akan lebih mudah terdistilasi daripada zat yang bertitik didih tinggi (Simanjuntak, 2009). Ekstraksi cair-cair adalah perpisahan satu komponen bahan atau lebih dari suatu campuran yang dipisahkan dengan bantuan pelarut (Rahayu, 2009). Ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction*) adalah metode yang dapat digunakan untuk pemisahan dan purifikasi sampel dalam bidang industri farmasi, maupun analisis toksikologi seperti, cairan, darah, dan serum (Rahmatia, 2016).

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen-komponen dalam fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa gas atau cairan, sedangkan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan. Fasa gerak berupa gas disebut kromatografi gas (*Gas Chromatography*). Kegunaan dari *gas chromatography* adalah untuk identifikasi semua jenis senyawa organik yang mudah menguap dan juga dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu campuran (McNair & Miller, 2009). Analisis kuantitatif dengan *gas chromatography* menggunakan metode standar internal. Metode ini digunakan karena terdapat ketidakpastian yang disebabkan injeksi sampel dan kecepatan aliran. Metode ini seringkali digunakan untuk sampel yang tidak sesuai atau tidak mungkin diinjeksi langsung pada *gas chromatography* (Hidayat *et al.*, 2015).

Penentuan metanol di dalam tubuh, seperti darah dapat dianalisis menggunakan *gas chromatography*. Sampel darah terlebih dahulu dipreparasi untuk menghilangkan pengotor. Pada penelitian ini sampel darah akan dipreparasi untuk menentukan kadar metanol dalam darah menggunakan *gas chromatography*. Tujuannya adalah untuk mengetahui preparasi yang paling tepat, cepat, dan akurat, untuk mencapai tujuan tersebut perlu dilakukan berbagai jenis metode preparasi sampel sebelum dianalisis menggunakan *gas chromatography*, setelah itu dilakukan uji validitas untuk membuktikan keandalan suatu metode dari suatu prosedur yang digunakan dengan beberapa parameter yaitu uji akurasi, uji presisi, dan uji linearitas.

Metode Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu seperangkat alat gelas merek pyrex, seperangkat alat distilasi, tabung SPE NT3, alat vakum, syringe, termometer, alat sentrifuse, instrumen *gas chromatography* (*Agilent Technologies 6890-N Network System*) dengan detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector*) dan kolom HP *Innowax* panjang 60 m; lebar 250 μm dengan fasa diam polietilen glikol. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel darah yang didapatkan dari sukarelawan pendonor, metanol, *n*-propanol, *Florisil*®, kKloroform, EDTA dengan *grade pro analyst* buatan *Merck*, serta aquades, kertas saring whatman, vial plastik, dan Vaseline.

Sampel diambil sebanyak 1 mL menggunakan pipet volume, kemudian ditambah 10 mL aquades, dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Didistilasi menggunakan distilasi sederhana selama 15 menit, dengan suhu dijaga sekitar $\pm 97^\circ\text{C}$ (titik didih *n*-propanol). Distilat dimasukkan ke dalam vial plastik. Distilat dianalisis menggunakan GC-FID (Shudaker & Jain, 2016).

Sampel diambil sebanyak 1 mL menggunakan pipet volume dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah kloroform 1 mL, dan disentrifuse selama 2 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dipipet dan dimasukkan ke dalam vial plastik. Supernatan dianalisis menggunakan GC-FID (Pizarro *et al.*, 2011).

Digunakan tabung SPE NT3, bagian bawah dilapisi dengan kertas saring whatman, kemudian ditambah Florisil® sampai tanda batas tabung dan dilapisi kembali dengan kertas saring whatman. Pengkondisian dilakukan dengan penambahan pelarut kloroform, dengan ditambah pelarut kloroform sebanyak 2 mL sampai menetes. Tabung SPE NT3 dikondisikan selama 24 jam dalam keadaan tertutup. Sampel dimasukkan sebanyak 1 mL, dan dielusi dengan pelarut kloroform sebanyak 1 mL. Larutan analit hasil dari ekstraksi fase padat-cair dimasukkan ke dalam vial plastik. Larutan analit dianalisis menggunakan GC-FID (Hernanz *et al.*, 2008).

Optimasi terhadap kondisi *gas chromatography* dilakukan sebelum melakukan pengukuran kadar sampel berdasarkan prosedur yang telah dilakukan oleh Suaniti *et al.* (2012) yang telah dimodifikasi yaitu suhu injektor 250°C, suhu detektor 300°C dengan split rasio 1:50, suhu awal kolom 50°C ditahan selama dua menit pada suhu tersebut, ditingkatkan secara bertahap sebesar 10°C/menit sampai suhu mencapai 200°C dan ditahan selama lima menit. Laju alir helium dari kolom yang terpilih adalah 1,2 mL/menit, laju alir nitrogen 30 mL/menit, laju alir gas hidrogen 35 mL/menit, dan laju udara sebagai pengoksida 350 mL/menit. Sampel diinjeksikan secara urut sebanyak 1,0 µL (Suaniti *et al.*, 2012).

Hasil dan Pembahasan

Sampel darah didapatkan dari pendonor sukarelawan yang diambil satu hari sebelum preparasi. Hal ini dilakukan agar sesuai dengan kondisi penanganan barang bukti dari korban di laboratorium forensik. Darah diambil menggunakan spuit kemudian diletakkan dalam wadah yang sudah berisi larutan EDTA. Larutan EDTA ini sebagai zat anti koagulen, kemudian darah disimpan dalam lemari pendingin pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ untuk menghindari kerusakan darah sebelum dipreparasi. Pembuatan larutan sampel darah mengandung metanol dilakukan dengan menambahkan metanol dengan konsentrasi 2%. *n*-Propanol dengan konsentrasi 2% juga ditambahkan dalam pembuatan larutan sampel sebagai standar internal. Sampel yang telah dibuat disentrifuse selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Fungsi dari sentrifuse ini adalah untuk memisahkan sel darah merah dengan serum darah, kemudian serum darah dapat digunakan untuk ekstraksi dengan ketiga metode. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan serum darah karena serum darah memiliki zat antigen lebih banyak daripada plasma darah. Serum memiliki zat antikoagulen yang dapat membuat reaksi kimia rusak dalam darah sehingga tidak efektif digunakan dalam proses penelitian. Volume sampel yang digunakan dalam ekstraksi pada penelitian ini dibuat sama yaitu sebanyak 1 mL. Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh metode preparasi terhadap perubahan konsentrasi akhir sehingga didapatkan metode yang paling optimum dan juga pengaruhnya dari setiap metode.

Metode yang pertama adalah distilasi. Prinsip distilasi sederhana adalah pemisahan dua zat atau lebih berdasarkan perbedaan titik didih (Simanjutak, 2009). Pada metode ini menggunakan pelarut aquades, kemudian didistilasi selama 15 menit dengan suhu dijaga 97°C (titik didih *n*-propanol) karena standar internal masuk dalam proses distilasi. Berdasarkan titik didihnya metanol keluar terlebih dahulu pada suhu $\pm 65^\circ\text{C}$ dan masuk ke dalam pipa pada kondensor dan terjadi proses pendinginan, kemudian turun menjadi tetesan yang disebut distilat (Simanjutak, 2009)

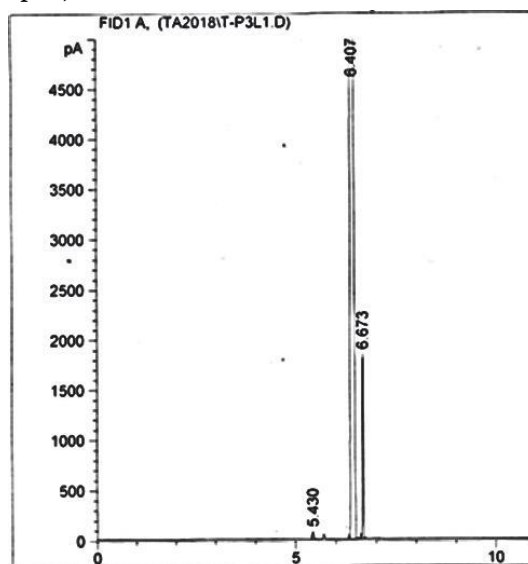
Metode yang kedua adalah ekstraksi cair-cair. Prinsipnya satu komponen bahan atau lebih dari suatu campuran dipisahkan dengan bantuan pelarut berdasarkan “*like dissolve like*”. Ekstraksi cair-cair ini bertujuan untuk memisahkan analit dari komponen pengotor atau impuritis dalam sampel (Tarigan, 2012). Metode ekstraksi ini menggunakan pelarut kloroform yang sudah terbebas dari metanol (Puslabfor Bareskrim Polri, 2017). Penggunaan kloroform sebagai pelarut karena kloroform termasuk ke dalam pelarut organik yang memiliki massa jenisnya lebih besar daripada air (Pizarro *et al.*, 2011) dan kloroform memiliki interaksi momen dipol sebesar 1,259 D (pada suhu 25 °C) termasuk kedalam pelarut semipolar (Poole *et al.*, 2010). Ekstraksi cair-cair ini dilakukan dengan diputar menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 2 menit. Pengadukan menggunakan sentrifuse dilakukan agar memberikan hasil ekstraksi yang maksimum dengan kecepatan konstan (Chambers *et al.*, 2013).

Metode yang terakhir adalah ekstraksi fase padat. Pada ekstraksi fase padat ini menggunakan adsorben berupa florisil dikarenakan memiliki kemampuan adsorpsi yang bagus berdasarkan interaksi semipolar, memiliki ukuran partikel yang cukup kecil 150-250 µm sehingga dapat menjerap larutan analit. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan melakukan pengkondisian florisil terlebih dahulu selama 24 jam dengan menggunakan kloroform yang berfungsi untuk mengaktifkan florisil. Analit yang terdapat dalam sampel dapat berinteraksi dengan florisil. Sampel dimasukkan ke dalam florisil yang telah dikondisikan.

Larutan analit akan berpindah dari larutan sampel dan terkonsentrasi pada lapisan florisil. Larutan analit akan berpindah dari adsorben dengan penambahan pelarut pengelusi yaitu menggunakan kloroform dan impuritis tetap berada di lapisan adsorben (Lukic *et al.*, 2006).

Pemisahan dengan metode *gas chromatography* berdasarkan pada perbedaan koefisien partisi dari senyawa yang diuapkan antara fase cair dan fase gas yang dilewatkan dalam kolom dengan bantuan gas pembawa. Masing-masing hasil dari preparasi sampel dianalisis dengan kondisi GC-FID. Kondisi analisis yang dipergunakan yaitu laju alir gas helium 40 mL/menit, laju alir dari kolom yang terpilih adalah 0,7 mL/menit., laju alir nitrogen 50 mL/menit, dan laju udara pengoksida 450 mL/menit. Suhu injektor 250 °C, suhu detektor 300°C. Suhu injektor < suhu kolom < suhu detektor. Suhu injektor harus cukup tinggi untuk menguapkan analit dengan cepat sehingga tidak menghilangkan keefisienan yang disebabkan oleh cara penyuntikan. Sebaliknya, suhu injektor harus cukup rendah untuk mencegah peruraian akibat panas. Suhu kolom harus cukup tinggi dengan suhu injektor agar analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang cukup layak dan pemisahan yang dikehendaki tercapai. Suhu detektor minimal harus 125 °C agar cuplikan tidak mengembun. Adanya pelebaran peak dan hilangnya *peak* komponen merupakan ciri khas pengembunan.

Sampel yang diinjeksikan menggunakan *split* rasio 1:50. *Split* injeksi dipilih karena sampel yang disuntikkan pada kolom kapiler terlalu kecil (*trace analysis*) yaitu 1,0 µL sehingga dilakukan suatu cara untuk mengecilkan ukuran sampel setelah penyuntikan dengan teknik *split*. Sampel dimasukkan ke dalam aliran gas pembawa. Setelah melewati gas pembawa, 1 aliran akan masuk ke kolom dan aliran lainnya akan dibuang. Gas pembawa yang digunakan gas helium. Gas helium memenuhi syarat sebagai gas pembawa karena tidak reaktif dan murni. Selain itu, gas helium memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik (mengurangi pelebaran pita).



Gambar 1. Kromatogram GC-FID methanol, *n*-propanol, dan kloroform hasil ekstraksi fase padat

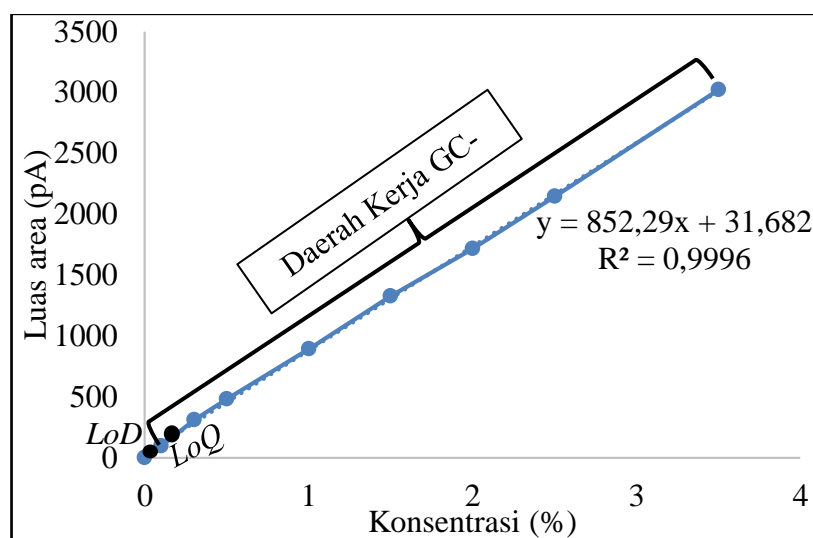
Hasil kromatogram GC-FID menunjukkan bahwa metanol muncul pada waktu retensi ±5,422 tidak sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Shudaker & Jain (2016) yaitu *n*-propanol muncul pada waktu retensi 2,452 menit dan waktu retensi etanol 1,992. Berdasarkan titik didih metanol yaitu 64,5 °C, metanol akan muncul pada tR 3,4. Waktu analisis menjadi hampir dua kali lipat dikarenakan panjang kolom yang digunakan diperbesar dari 30 m menjadi 60 m. Kloroform dan *n*-Propanol akan muncul masing-masing pada waktu retensi ±6,391 dan ±6,657. Waktu retensi metanol, kloroform dan *n*-Propanol semakin kecil dikarenakan kolom telah digunakan sehingga efisiensi kolom mulai berbeda (Gambar 1).

Linearitas menunjukkan suatu metode uji untuk mengetahui hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon detektor. Larutan standar yang telah dibuat dan dianalisis menggunakan *gas chromatography*, kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan cara konsentrasi versus luas area (Gambar 2). Miller & Miller (2005) menjelaskan bahwa dalam suatu analisis harga koefisien korelasi ini sebanyak $r^2 > 0,99$. Pada penelitian ini persamaan regresi yang dihasilkan menggunakan *gas chromatography-flame ionization detector* yaitu $y=852,29x+31,682$ dengan nilai koefisien korelasi sebesar $r^2=0,9996$. Koefisien korelasi (r^2) tersebut sesuai dengan syarat keberterimaan oleh Miller & Miller (2005) yaitu harga koefisien korelasi sebanyak $r^2 > 0,99$. Hasil tersebut menunjukkan alat yang digunakan mempunyai respon yang

baik terhadap sampel. Alat dapat memberikan hubungan yang linier antara luas area atau intensitas dengan konsentrasi analit yang diukur. Demikian dapat dikatakan persamaan regresi yang diperoleh dapat digunakan dalam menghitung konsentrasi sampel.

Tabel 1. Analisis data dari *limit of detection* (LoD) dan *limit of quantitation* (LoQ)

Konsentrasi (%)	Luas area	\hat{y}	$(y - \hat{y})$	$(y - \hat{y})^2$
0	0	31,682	-31,682	1003,749
0,1	99	116,911	-17,911	320,8039
0,3	310,9	287,369	23,531	553,708
0,5	484,4	457,827	26,573	706,1243
1	893,3	883,972	9,328	87,0116
1,5	1327,8	1310,117	17,683	312,6885
2	1718,7	1736,262	-17,562	308,4238
2,5	2146,9	2162,407	-15,507	240,467
3,5	3020,3	3014,697	5,603	31,3936
	Σ			3564,37
	SD			21,108
	% LoD			0,0743
	% LoQ			0,2477



Gambar 2. LoD, LoQ, dan daerah kerja GC-FID

Limit of Detection (LoD) yaitu jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Apabila konsentrasi analit berada di bawah *LoD* maka sinyal yang ditangkap sepenuhnya adalah *noise*. *Limit of Detection* (LoD) adalah parameter uji batas (Hidayati, 2013). *Limit of Quantitation* (LoQ) yaitu konsentrasi terendah dari analit yang terkandung dalam sampel yang dapat dikuantifikasi.

Tabel 1. menunjukkan hasil analisis dengan GC-FID, *limit of detection* (LoD) alat yang didapatkan sebesar 0,0743%, ini berarti konsentrasi metanol yang dapat dideteksi oleh alat apabila konsentrasinya lebih besar dari LoD. Apabila konsentrasi analit kurang dari LoD, maka sinyal yang ditangkap sepenuhnya *noise*, sehingga sinyal yang didapat tidak dapat dipercaya. Besarnya *Limit of Quantitation* (LoQ) pada *gas chromatography* sebesar 0,2477%. LoQ menentukan batas rentang kerja yang harus dicapai dalam pengukuran. Nilai LoD dan LoQ ini lebih kecil daripada penelitian yang dilakukan oleh Agustina (2018) yaitu LoD sebesar 2,14% dan LoQ sebesar 7,14% pada penentuan kadar etanol dan metanol dalam minuman beralkohol menggunakan GC-FID, ini berarti alat yang digunakan dalam penelitian ini memiliki tingkat kepekaan yang lebih tinggi.

Tabel 2. Hasil uji akurasi pada metode distilasi, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat

Metode	% Recovery (%)
Distilasi	98,37
Ekstraksi cair-cair	89,84
Ekstraksi fase padat	82,05

Uji perolehan kembali bertujuan untuk mengamati perbandingan respon detektor analit yang dipreparasi dari sampel biologis dengan respon detektor dari kadar yang sebenarnya. Uji ini memberikan informasi tentang efisiensi preparasi yang digunakan dalam analisis. Hasil perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten dan presisi (Tarigan, 2012).

Uji perolehan kembali analit yang digunakan memiliki beberapa syarat. Syarat larutan standar yang ditambahkan ke sampel harus memiliki sifat-sifat, seperti kemurnian tinggi dan memiliki matriks hampir sama dengan sampel (Riyanto, 2014). Peneliti menambahkan analit tiga kadar bertingkat yaitu 0,13%, 0,135%, dan 0,14%. Penambahan analit dilakukan sebelum sampel dipreparasi, sehingga dapat diketahui metode preparasi yang digunakan memberikan nilai kecermatan yang baik atau tidak. Hasil analisis pada metode distilasi didapatkan %recovery sebesar 98,37%. Angka ini menunjukkan konsentrasi metanol yang terukur adalah 98,37% dari keseluruhan metanol yang ada dalam sampel dan sisa persentasenya, metanol tidak ikut terambil pada saat proses preparasi atau hilang pada saat proses preparasi dan saat analisis menggunakan GC-FID. Hasil %recovery yang didapat lebih bagus daripada penelitian yang dilakukan oleh Shudaker & Jain (2016) menghasilkan %recovery sebesar 83,7% pada sampel darah menggunakan analisis *headspace gas-gas chromatography-flame ionization detector*. Hasil %recovery dari ekstraksi cair-cair yaitu sebesar 89,84%, sedangkan hasil %recovery dari ekstraksi fase padat yaitu sebesar 82,05%.

Berdasarkan hasil %recovery diatas, metode yang recoverynya memenuhi adalah metode distilasi karena rata-rata %recovery memasuki range 97-103% dari konsentrasi analit akhir yang didapatkan $1 < x \leq 10\%$ (Harmita, 2004), untuk metode ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat belum memenuhi dikarenakan %recovery yang diperoleh kurang dari 95-105% karena konsentrasi analit yang didapat sebesar $0,1 < x \leq 1\%$ yang berarti hasil pengukuran terlalu kecil dari konsentrasi sebenarnya. Padahal penelitian yang dilakukan oleh Pizzaro *et al.* (2011) mengatakan kloroform baik digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi cair-cair untuk senyawa volatil dalam minuman beralkohol, namun tidak melakukan penelitian recovery yang didapat dari penelitian tersebut hanya menunjukkan dapat menangkap beberapa senyawa volatil seperti metanol.

Penyebab lain mungkin disebabkan oleh beberapa faktor. Faktor pertama adalah ketidakpastian. Penyebab ketidakpastian yaitu ketidakpastian dalam kalibrasi baik dalam penggunaan alat maupun dalam pembacaan skala. Faktor kedua adalah proses ekstraksi yang menyebabkan %recovery menjadi kecil, karena metanol mulai hilang pada proses ekstraksi dan penggunaan kloroform sebagai pelarut yang menyebabkan analit sukar terlepas, jadi analit lebih suka tetap di sampel. Martineli *et al.* (2013) mengatakan *Florisil*® dapat digunakan sebagai sorbent dalam ekstraksi fase padat dan menjerap senyawa volatil seperti alkohol, namun penggunaan *Florisil*® sebagai adsorben dalam ekstraksi fase padat ini menyebabkan impuritis tidak seutuhnya terjebak di dalam florisil, namun ikut keluar bersama analit yang menyebabkan konsentrasi analit menjadi rendah.

Tabel 3. Hasil Presisi pada metode distilasi, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat

Metode	%RSD (%)
Distilasi	2,16
Ekstraksi cair-cair	4,16
Ekstraksi fase padat	9,04

Uji ini dilakukan untuk melihat apakah metode atau alat instrumen dapat memberikan ulangan pengukuran yang bagus. Presisi menggambarkan kesalahan acak dari suatu hasil pengukuran. Kesalahan acak berasal dari pengaruh-pengaruh yang tidak dapat diperkirakan. Pada penentuan presisi terdapat tiga pendekatan. Pendekatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah keterulangan (*repeatability*) yaitu presisi pada kondisi percobaan yang sama baik orangnya, tempatnya, peralatannya, maupun waktunya (Riyanto, 2014). Metode presisi ini yang paling sesuai digunakan, karena sampel yang digunakan termasuk senyawa organik yang mudah menguap. Pada metode *repeatability* ini pengukuran dilakukan dengan mengekstraksi sampel menggunakan tiga metode tersebut dengan pengulangan tiga kali untuk setiap metodenya.

Hasil analisis uji presisi pada metode distilasi menghasilkan %RSD sebesar 2,16%. Hasil tersebut menurut Riyanto (2014) tidak masuk ke dalam syarat keberterimaan %RSD berdasarkan konsentrasi analit yang didapatkan. Oleh karena itu perlu dibandingkan dengan persamaan CV Horwitz. Aradea (2014)

mengatakan uji presisi dianggap baik apabila %RSD masuk dalam kriteria keberterimaan yaitu %RSD < 2/3 CV Horwitz. Hasil analisis pada metode distilasi diketahui bahwa %RSD memenuhi syarat keberterimaan menurut Aradea (2014) yaitu nilai %RSD < 2/3 CV Horwitz. Hal ini menunjukkan metode distilasi memiliki keterulangan yang baik. Pada metode ekstraksi cair-cair menghasilkan %RSD 4,16% dan ekstraksi fase padat menghasilkan %RSD 9,04%. Nilai presisi tersebut sesuai dengan syarat keberterimaan %RSD menurut Riyanto (2014), namun tidak sesuai dengan syarat keberterimaan menurut Aradea (2014) yaitu %RSD < 2/3 CV Horwitz. Semakin kecil %RSD maka presisinya semakin baik, dan sebaliknya jika %RSD semakin besar maka kesalahan yang terjadi semakin besar sehingga presisinya semakin jelek, jika dibandingkan antara ketiga metode. Metode distilasi dan ekstraksi cair-cair dikatakan memiliki presisi dengan ketelitian sedang karena $2\% < RSD \leq 5\%$ sedangkan untuk metode ekstraksi fase padat dikatakan tidak teliti karena %RSD > 5% (Riyanto, 2014). Kelemahan metode *repeatability* adalah dilakukan pada hari yang sama dan laboratorium yang sama sehingga kesalahan yang ditimbulkan relatif kecil dibanding metode lainnya, agar menghasilkan tingkat kevalidan yang tinggi, untuk itu perlu dilakukan uji presisi dengan metode lainnya.

Berdasarkan penelitian ini didapatkan hasil analisis uji akurasi dengan metode distilasi yang paling mendekati 100% dan memenuhi syarat keberterimaan sehingga menunjukkan metode tersebut memiliki ketepatan yang baik dalam menunjukkan tingkat kesesuaian hasil pengukuran konsentrasi yang sebanding dengan nilai sebenarnya dalam sampel. Hasil uji presisi pada metode distilasi juga menunjukkan keterulangan yang paling bagus dibandingkan dengan metode yang lainnya.

Demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa metode yang paling optimum untuk digunakan dalam menentukan kadar metanol dalam darah menggunakan *gas chromatography* adalah metode distilasi berdasarkan uji presisi dan uji akurasinya. Metode distilasi yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan distilasi tertutup, sehingga kecil kemungkinan sampel akan menguap pada saat proses distilasi. Bekatorou (2016) mengatakan minuman beralkohol yang didistilasi dapat meningkatkan kandungan metanol dari minuman beralkohol, karena distilasi berpotensi memusatkan kandungan metanol dalam distilat, distilasi juga sangat penting untuk menentukan kualitas minuman alkohol, terutama dalam produk alkohol yang tidak dilaporkan dan dipalsukan.

Simpulan

Metode distilasi, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi fase padat dalam penentuan kadar metanol dalam darah yang diuji menggunakan *gas chromatography* memiliki pengaruh dan memberikan hasil yang paling optimum terdapat pada metode distilasi. Berdasarkan nilai dari %RSD dan %recovery, metode distilasi menghasilkan %RSD sebesar 2,16% dan %recovery sebesar 98,37%.

Daftar Pustaka

- Agustina, A. 2018. Validasi Metode Penetapan Kadar Metanol dan Etanol dalam Minuman Beralkohol dengan Kromatografi Gas di Badan Reserse Kriminal POLRI Pusat Laboratorium Forensik. *Skripsi*. Yogyakarta: FMIPA Universitas Islam Indonesia
- Aradea, A. 2014. *Your Reliable Partner for Accredited Lab*. Semarang: PT Merck Tbk
- Bekatorou, A. 2001. Alcohol: Properties and Determination. *Encyclopedia of Food and Health*, 9(1): 8-92
- 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
- Evans, C., A. Mark, B. Peter, D. Jeffrey, A.J. Christopher, L. Wenkui, & L. Steve. 2015. Sampling for Clinical Pharmacokinetic Determinations: Considerations from the IQ Consortium Microsampling Working Group. *Journal The AAPS*, 17(2): 292-300
- Hamidah, M. & K. Yulianti. 2017. Temuan Post Mortem Akibat Keracunan Metanol. *E-Jurnal Medika*, 6(7): 1-5
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Ilmu Kefarmasian*, 1(3): 119-222
- Hernanz, D., V. Gallo, & A.N.F. Recamales. 2008. Comparison of The Effectiveness of Solid-Phase and Ultrasound-Mediated Liquid-Liquid Extractions to Determine the Volatile Compounds of Wine. *Talanta*, 76(4): 929-935

- Hidayati, E.N. 2013. Perhitungan Metode Destruksi pada Analisis Pb dalam Rambut dengan AAS. *Skripsi*. Semarang: Universitas Negeri Semarang
- Hidayat, R., S.P. Pasaribu, & C. Saleh. 2015. Penggunaan Internal Standar Nitrobenzena untuk Penentuan Kuantitatif Btex dalam Kondensat Gas Alam dengan Kromatografi Gas. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 12(2): 90-96
- Hikmah, M.N. & Zuliyana. 2010. Produksi Metil Ester (Biodiesel) dari Minyak Dedak dan Metanol dengan Proses Esterifikasi dan Transesterifikasi. *Skripsi*. Semarang: FMIPA Universitas Diponegoro
- Lestari, I. 2015. Pengaruh Penambahan Susu, Madu, Minuman Bersoda dan Minuman Energi terhadap Kadar Alkohol pada Minuman Keras. *Jurnal Kesehatan Prima*, 9(1): 1383-1384
- Martinesi, M., A.A.R. Alves, & T.M. Uekane. 2013. Analysis of Volatile Compounds in 'Fuyu' Persimmon: Comparison of Extraction Techniques by GC-qMS. *15th International Symposium on Advances in Extraction Technologies*. Brasil: Universitas Federal Rio de Janeiro
- McNair, H.M. & M. Miller. 2009. *Basic Gas Chromatography* (2nd ed). United States of America: A John Wiley & Sons, Inc.
- Miller, J.C. & J.N. Miller. 2005. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (5th ed). England: Pearson Education Limited
- Pizzaro, C., C.S Gonzalez, N. Perez, 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(1): 1576-1584
- Pontes, H., P. Guedes, & S. Casal. 2009. GC Determination of Acetone, Acetaldehyde, Ethanol, and Methanol in Biological Matrices and Cell Culture. *Journal of Chromatographic Science*, 47(1): 272-278
- Poole, C.F. & S.K. Poole. 2010. Extraction of Organic Compounds with Room Temperature Ionic Liquids. *Journal of Chromatography A*, 1217(1): 2269-2284
- Puslabfor Bareskrim Polri. 2017. *Instruksi Kerja Laboratorium Forensik Cabang Semarang*. Semarang: Labforcab Semarang
- Rahayu, S. 2009. Pengaruh Perbandingan Berat Bahan dan Waktu Ekstraksi terhadap Minyak Biji Pepaya Terambil. *Jurnal Industri dan Informasi*, 4(5): 147-151
- Rahmatia, T.U. 2016. Metode SPE (*Solid Phase Extraction*) sebagai Alternatif Terbaru dalam Analisis dan Pemurnian Senyawa Obat. *Jurnal Farmaka*, 14(2): 151-171
- Riyanto, P.D., 2014. *Validasi & Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi* (1st ed.). Yogyakarta: Deepublish
- Shindyapina, A.V., I.V. Petrunia, T.V. Komarova, E.V. Sheshukova. 2014. Dietary Methanol Regulates Human Gene Activity. *Journal Plos One*, 9(7): 1-6
- Simanjuntak, R. 2009. Studi Pembuatan Etanol Ddari Limbah Gula (*Molase*). *Skripsi*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Suaniti, N.M., I.A.R.A. Asih, & N.P.W. Astuti. 2012. Deteksi Etanol Setelah Konsumsi Arak dalam Urin dengan Gas Chromatography. *Jurnal Kimia*, 6(2): 123-124
- Tarigan, E.Y. 2012. Optimasi dan Validasi Metode Analisis Raberprazol dalam Plasma In Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Skripsi*. Jakarta: Universitas Indonesia