

Penentuan Kandungan Etanol dalam Makanan dan Minuman Fermentasi Tradisional Menggunakan Metode Kromatografi Gas

Dhony Hermanto^{*1,2}, I.G. Ayu Sri Andayani², Ruru Honiar², Linda Marta Shofiyana², Nurul Ismillayli¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram; Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Nusa Tenggara Barat 83125

²Laboratorium Kimia Analitik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mataram; Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Nusa Tenggara Barat 83125

e-mail*¹ dhony.hermanto@unram.ac.id

Diterima: 23 Maret 2020/ Disetujui: 15 Mei 2020/ Dipublikasi online: 14 Januari 2021

DOI: <https://doi.org/10.22437/chp.v5i2.8979>

ABSTRAK

Penentuan kandungan alkohol dengan menggunakan metode GC dalam makanan dan minuman hasil fermentasi perlu dilakukan untuk menjamin kehalalannya. Metode ini dapat mengatasi kelemahan metode sebelumnya yaitu alkoholmeter yang umum digunakan oleh produsen makanan dan minuman walaupun sensitivitasnya rendah. Penentuan kadar alkohol pada beberapa makanan tradisional hasil fermentasi menggunakan standar etanol dan n-butanol sebagai standar internal. Pengukuran menggunakan alkoholmeter juga dilakukan terhadap sampel makanan minuman fermentasi sebagai pembandingan. Hasil pengukuran GC juga dibandingkan dengan kadar alkohol yang tertera pada kemasan bir (value declared by the producer). Hasil pengukuran menunjukkan daerah linier pada interval 1 hingga 10% dengan nilai koefisien korelasi (r) adalah 0.9984, dengan demikian metode GC mempunyai linieritas tinggi. Nilai batas deteksi senyawa standar etanol adalah 0,5 ng, koefisien variasi (CV) $\leq 2\%$, ketepatan (K) $\leq 5\%$ dan perolehan kembali pada rentang 98-102% yang menunjukkan bahwa alat GC mempunyai sensitifitas, ketelitian, validitas dan perolehan kembali yang tinggi. Kadar alkohol pada sampel bir yang tertera dalam kemasan menunjukkan kesesuaian dengan dengan hasil pengukuran GC. Hasil uji anova menunjukkan bahwa antara metode GC dan alkoholmeter tidak terdapat perbedaan hasil secara signifikan sehingga metode GC dan alkoholmeter dapat digunakan sebagai alternatif yang baik dalam penentuan kadar etanol dalam makanan dan minuman fermentasi sebagai penunjang dalam verifikasi halal.

Kata kunci: alkohol, makanan, minuman, fermentasi, halal, GC, alkoholmeter

ABSTRACT

Determination of alcohol content by using the GC method in fermented foods and drinks was needed for halal verification. This method can overcome the weaknesses of previous method, namely alcoholmeter which is commonly used by food and beverage producers even though its sensitivity is low. Determination of alcohol content in some traditional fermented foods used ethanol and n-butanol standards as internal standards. Measurements using an alcoholmeter were also conducted on fermented beverage food samples as a comparison. The GC measurement result were also compared with alcohol content printed on the packaging (value declared by the producer). The result showed that linear range in ethanol concentration was 1-10% with correlation coefficient (r) of 0.9984, indicated that GC has excellent linearity. Limit of detection was 0,5 ng, coefficient variance (CV) was $\leq 2\%$, accuracy (K) was $\leq 5\%$ and recovery was in the range of 98-102%, indicated that

GC method has high sensitivity, accuracy, validity and recovery. Alcohol content in beer samples listed in the packaging was confirmed with GC measurement results. Anova test results showed that the GC methods with alcoholmeter methods did not differ significantly so that the GC and alcoholmeter methods can be used as a good alternative in determining the ethanol content in fermented foods and beverages as a support in halal verification.

Keywords: alcohol, food, beverage, fermentation, halal, GC, alcoholmeter.

PENDAHULUAN

Produk makanan dan minuman sebagai bagian dari kehidupan kita sehari-hari, telah diatur dalam hukum Islam terkait dengan kehalalannya. Alkohol dalam produk makanan dan minuman adalah masalah serius dan haram untuk dikonsumsi umat Muslim. Oleh karenanya, verifikasi halal dan otentikasi produk makanan adalah masalah yang menjadi perhatian utama terkait dengan kandungan dan kadar alkohol dalam produk makanan dan minuman (LPPOM-MUI, 2008). Etanol sebagai analit dari golongan alkohol yang paling umum diidentifikasi di laboratorium ditemukan pada makanan dan minuman hasil fermentasi (Destanoglu dan Ates, 2019). Analisis etanol untuk mengendalikan proses fermentasi dan kualitas produknya dapat dilakukan menggunakan metode analisis yang sederhana, cepat dan ekonomis (Muchtaridi *et al.*, 2012).

Saat ini, penentuan etanol dalam produk makanan dan minuman hasil fermentasi dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain depresi titik didih larutan etanol (Yang *et al.*, 2012), analisis densimetri (piknometer) (Moales *et al.*, 2010), metode indeks bias (Gerogiannaki-Christopoulou *et al.*, 2003), *colorimetric* spektrofotometri oksidasi dikromat (Sumbhate *et al.*, 2012), metode enzimatis (Ishmayana *et al.*, 2015), biosensor (Azevedo *et al.*, 2005; Kuswandi *et al.*, 2014), potensiometri (Rotariu *et al.*, 2004), kromatografi gas (GC) (Wang *et al.*, 2003), elektroforesis kapiler (Frazier, 2001), kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) (Parpinello dan Versari, 2000), spektrometri Raman modular (Sanford *et al.*, 2001), dan spektroskopi FTIR atau IR-dekat (NIR) (Lachenmeier *et al.*, 2010). Prosedur pretreatment yang rumit (mis. distilasi sampel dan proses penimbangan yang akurat) dan volume sampel yang besar diperlukan. Metode yang paling populer (mis. analisis piknometri dan analisis densimetri) tidak berlaku untuk sampel dengan jumlah kecil. Proses oksidasi pada spektrofotometri oksidasi distilat dan dikromat diperlukan lebih dari 5 mL volume sampel untuk analisis serta reagen yang digunakan sangat beracun dan terklasifikasi. Stabilitas rendah, reproduktifitas rendah dan akurasi rendah adalah kerugian untuk metode

enzimatik, biosensor, dan potensiometri. Spektrometri Raman dan elektroforesis kapiler tidak populer karena diperlukan instrumen mahal. Prosedur pra-perlakuan sampel seperti distilasi dan proses penimbangan yang akurat masih diperlukan dan spektrofotometri yang digunakan untuk deteksi analit, sehingga metode HPLC memiliki sensitivitas yang relatif rendah. Spektroskopi NIR dan penganalisa bir memakan waktu dalam membuat kurva kalibrasi dan memiliki akurasi rendah karena dapat diganggu oleh alkohol lain dalam sampel. Kelemahan yang ada pada beberapa metode analisis etanol di atas dapat diatasi dengan metode GC. Metode GC digunakan untuk analisis etanol karena kemudahan analisis, sensitivitas, akurasi, spesifisitas relatif, pengukuran yang cepat dan jumlah sampel yang kecil (Mohammed *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini penentuan kadar etanol pada berbagai produk makanan dan minuman hasil fermentasi dilakukan dengan metode GC. Analisis kuantitatif untuk etanol dengan metode GC (Angelescu *et al.*, 2017; Tiscione *et al.*, 2011) didapatkan dengan membandingkannya dengan etanol standar dan digunakan n-butanol sebagai standar internal (Fu *et al.*, 2015; Hönig *et al.*, 2015). Hasil dari metode GC digunakan untuk memverifikasi penentuan kadar etanol yang ada pada industri rumahan yaitu menggunakan alkoholmeter. Penentuan kadar etanol dengan alkoholmeter ini didasarkan pada berat jenis larutan. Verifikasi dan otentifikasi kehalalan menggunakan GC terhadap produk makanan dan minuman hasil fermentasi dapat menghilangkan keraguan umat muslim untuk mengkonsumsi produk tersebut.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Etanol absolut (99%, Merck) digunakan sebagai material pembanding dari sampel target dengan analit etanol. n-Butanol (0,5% V/V, Merck) digunakan sebagai standar internal untuk memastikan bahwa tidak ada gangguan dengan puncak etanol pada pengukuran metode GC. Kertas saring Watman No. 1. Sampel adalah makanan dan minuman tradisional Lombok hasil fermentasi yaitu poteng ambon (tape singkong) dan poteng jaje tujak (tape beras ketan) dan minuman fermentasi dengan lama pemeraman 24 jam seperti tuak (fermentasi air nira dan kayu bakah) dan brem (air hasil fermentasi beras ketan dan kayu bakah).

GC dilengkapi dengan oven yang mampu beroperasi secara isothermal pada suhu 115 °C. Auto-sampler GC untuk menyuntikkan 0,5–1 µL sampel cairan, atau jarum suntik dengan perpindahan positif 10 µL. Peralatan lain yaitu auto-diluter

yang mampu diencerkan $10 \pm 0,1\%$, bak air dengan kontrol hingga $20 \pm 0,5$ °C, termometer akurat hingga $0,1$ °C, kolom kromatografi Rtx®-5MS dengan 5% difenil/95% dimetil polisiloksan (semi polar) panjang 30 m dan id $0,25$ mm.

Prosedur pengukuran

Preparasi sampel, Sampel tuak dan brem yang berupa cairan dipreparasi dengan menyesuaikan suhu sampel hingga 20 °C. Sedangkan sampel padatan yaitu poteng ambon dan poteng jaje tujak ditimbang sebanyak 25 gram, dihaluskan dan ditambahkan 25 mL aquades. Campuran kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat. Filtrat disesuaikan suhunya hingga 20 °C. Masing-masing sampel sebanyak 25 ml disaring ke dalam tabung berbentuk kerucut. Corong saringan ditutup dengan penutup kaca untuk mencegah hilangnya etanol. Tempatkan labu di bak ultrasonik dan sonicate untuk menghilangkan karbon dioksida yang tersisa. Tutup labu sampai dilakukan analisis.

Preparasi standar, standar etanol dibuat dengan konsentrasi $1, 2, 5, 8$ dan 10 %V/V. Pastikan pipet, jarum suntik, etanol, air dan larutan etanol encer yang dihasilkan semuanya ada pada $20 \pm 0,1$ °C. Periksa kandungan etanol dari larutan standar dengan mengukur gravitasi spesifik baik dengan botol atau meter gravitasi.

Kalibrasi, standar internal n-butanol dan standar kalibrasi etanol dijaga pada suhu $20 \pm 0,1$ °C. Kondisikan GC sesuai kondisi umum antara lain suhu oven 115 °C, suhu injector 150 °C, suhu detektor 200 °C, gas pembawa digunakan nitrogen, kecepatan aliran gas pembawa 45 mL/mnt. Setiap mL standar etanol diencerkan dengan 20 mL standar internal n-butanol menggunakan diluter otomatis atau dengan pipetting ke dalam labu kerucut 50 mL. Pastikan kedua larutan berada pada $20 \pm 0,1$ °C sebelum diencerkan, hal ini penting untuk akurasi metode ini. Suntikkan $0,5-1$ μ L dari setiap larutan etanol standar ke dalam GC. Tentukan luas puncak standar internal etanol dan n-butanol.

Penentuan alkohol dalam sampel dengan metode GC, filtrat sampel dijaga pada suhu $20 \pm 0,1$ °C. Larutkan 2 mL sampel dengan 20 mL n-butanol standar internal. Suntikkan $0,5-1$ μ L dari setiap larutan etanol standar ke dalam GC. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada larutan sampel dalam n-butanol. Luas puncak standar internal etanol dan n-butanol dihitung.

Perhitungan, plot grafik dari luas puncak etanol luas puncak standar internal terhadap konsentrasi etanol % V/V (setelah dikoreksi untuk kemurnian) dari hasil yang diperoleh untuk masing-masing standar kalibrasi.

Grafik harus linier dan harus melewati titik asal. Hitung koefisien korelasi (r) (untuk akurasi $r \sim 0,99$) dan hitung gradien untuk memberikan faktor F . F adalah perbandingan konsentrasi etanol dengan luas puncak etanol atau luas puncak standar internal.

Validasi metode analisis GC, dilakukan dengan menentukan beberapa karakteristik metode seperti linieritas, batas deteksi, ketelitian dan ketepatan. Uji linieritas dilakukan dengan mengukur rasio luas area etanol terhadap n-butanol pada suatu seri larutan standar etanol dengan konsentrasi 1, 2, 5, 8 dan 10 % (V/V). Masing-masing larutan sebanyak 0,5-1 μ L diinjeksikan ke dalam GC dan dilakukan penentuan luas puncak etanol dan n-butanol. Masing-masing perlakuan dilakukan 3 kali pengulangan. Grafik konsentrasi etanol diplotkan dengan rasio luas puncak etanol terhadap n-butanol sehingga didapatkan suatu garis lurus dengan persamaan $y = ax + b$, dengan $r \sim 0,99$ agar memenuhi parameter linieritas. Batas deteksi ditentukan dari data persamaan regresi sedangkan Ketelitian ditentukan dari simpangan baku dan koefisien variasinya dan Ketepatan (K) tergantung pada besarnya penyimpangan data dari nilai rata-rata dengan nilai sebenarnya.

Alat yang digunakan untuk mengukur kadar alkohol pada industri rumah tangga adalah alkoholmeter atau hidrometer alkohol. Prinsip alkoholmeter adalah berdasarkan berat jenis larutan, dimana berat jenis larutan etanol berbanding terbalik dengan kadarnya. Langkah-langkah pengukuran menggunakan alkoholmeter adalah dengan memasukkan destilat masing-masing sampel yang mengandung etanol sebanyak 100 mL ke dalam gelas ukur, kemudian alkoholmeter dicelupkan ke dalam destilat tersebut. Batas yang tercelup pada permukaan destilat menunjukkan kadar alkohol pada sampel yang diuji. Uji anova digunakan untuk melihat perbedaan validitas yang bermakna antara metode GC dan berat jenis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

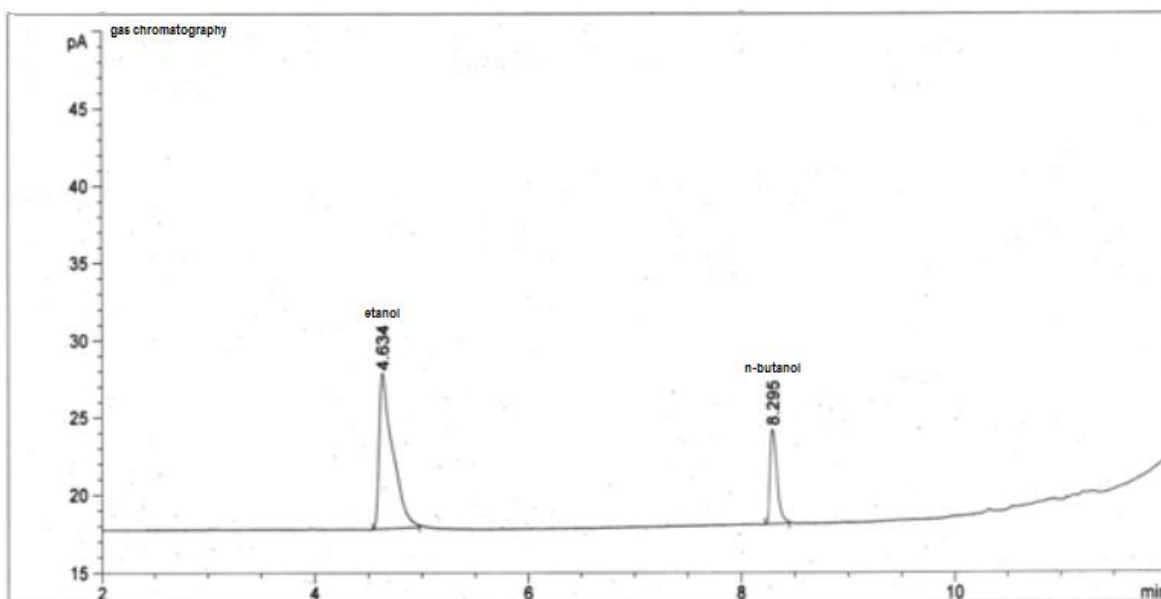
Etanol pada produk makanan dan minuman hasil proses fermentasi yaitu hasil yang diperoleh dari peragian karbohidrat yang berkataliskan enzim. Satu tipe enzim mengubah karbohidrat menjadi glukosa kemudian menjadi etanol, tipe yang lain menghasilkan cuka (asam asetat), dengan etanol sebagai perantara. Peragian/fermentasi dilakukan dengan bantuan sebagian spesies ragi tertentu seperti *Saccharomyces Cerevisiae*. Ragi ini memetabolisme gula (glukosa) tanpa

adanya oksigen menghasilkan etanol dan CO₂, reaksinya mengikuti persamaan reaksi (1)



Penetapan kadar etanol dengan metode GC dapat dilakukan karena etanol merupakan senyawa mudah menguap. Larutan etanol disuntikkan dengan menggunakan mikro *syringe* ke dalam kolom pemisah GC. Pada tempat injeksi larutan langsung menguap dan masuk ke dalam kolom bersama dengan gas pembawa yang *inert*. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen gas menurut titik didih dan polaritas masing-masing senyawa. Komponen-komponen gas yang telah terpisah dan keluar dari kolom kemudian masuk ke detektor dan sinyal yang terdeteksi dicatat pada *recorder* atau integrator. Kadar etanol dapat diketahui dengan menghitung luas puncak area kromatogram etanol yang tercatat pada *recorder*.

Titik didih etanol adalah 78,3 °C dan titik didih n-butanol adalah 117-118 °C, untuk hal ini suhu injektor pada 150 °C agar terjadi penguapan sampel secara langsung saat sampel disuntikkan ke dalam *injector*. Suhu kolom dan detektor diatur pada suhu 115 °C dan 200 °C bertujuan untuk menjaga eluen tetap berada pada fase gas. Kondisi kromatografi ini dibuat tetap selama penelitian untuk memperkecil kesalahan alat. Kromatogram larutan standar etanol dan n-butanol dapat dilihat pada Gambar 1.

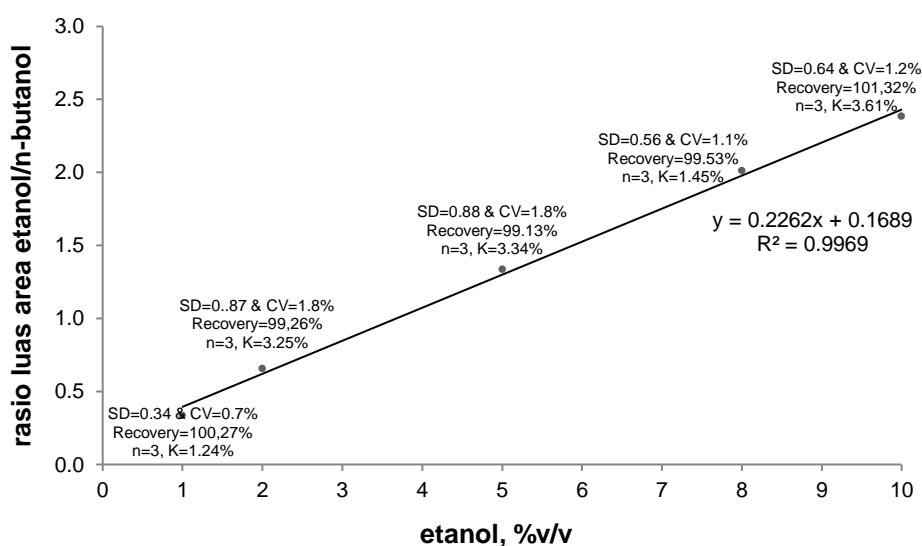


Gambar 1. Kromatogram larutan standar etanol dan n-butanol ratio 1:1 konsentrasi 50 ppm.

Gambar 1 kromatogram larutan standar menunjukkan puncak kromatogram pada waktu retensi 4.634 (etanol) dan 8,295 (n-butanol). n-butanol digunakan sebagai standar internal, hal ini karena n-butanol mempunyai struktur kimia dan sifat-sifat fisika yang hampir mirip dengan etanol. Standar internal digunakan dalam analisis berdasarkan kromatogram disebabkan oleh adanya fluktuasi parameter alat yang mempengaruhi keakuratan dalam analisis.

Nilai resolusi menunjukkan derajat pemisahan komponen campuran dalam analisis kromatografi gas dengan selektifitas tinggi pada kondisi optimum. Pada Gambar 1 menunjukkan komponen campuran terpisah secara sempurna (etanol dan n-butanol). Nilai selektivitas dikategorikan baik dengan $R_s \geq 1,5$ ditunjukkan pada kromatogram terjadi pemisahan secara sempurna dari campurannya.

Karakteristik analitik digunakan untuk memvalidasi suatu metode analisis, hal ini dimungkinkan untuk meminimalisasi penyimpangan data analisis yang diperoleh dari keadaan sebenarnya. Validasi metode dilakukan bertujuan untuk memberikan hasil yang mendekati kebenaran. Karakteristik analisis dalam metode GC antara lain linieritas, batas deteksi, ketepatan dan ketelitian. Kurva kalibrasi GC larutan standar etanol dan n-butanol dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kurva kalibrasi rasio luas area etanol/n-butanol terhadap konsentrasi etanol

Nilai koefisien korelasi digunakan sebagai parameter untuk menentukan linieritas, yang dapat ditentukan dari kurva kalibrasi. Gambar 2 menunjukkan daerah linier pada interval 1 hingga 10% etanol mengikuti persamaan garis $y = 0.2262 [\text{etanol}] + 0.1689$. Berdasarkan kurva kalibrasi, nilai koefisien korelasi (r)

adalah 0.9984 atau $r \approx 1$, dengan demikian metode GC mempunyai linieritas tinggi.

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat dideteksi dan memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Perhitungan dari hasil penelitian menunjukkan nilai batas deteksi senyawa standar etanol adalah 0,5 ng, artinya batas deteksi standar dibawah 5,0 ng. Alat kromatografi gas dapat memberi respon pada konsentrasi yang sangat kecil yaitu 5,0 ng, maka alat kromatografi gas mempunyai sensitifitas yang tinggi.

Validasi ketelitian dapat ditentukan dari simpangan baku dan koefisien variasinya. Koefisien variasi (CV) menunjukkan suatu ketidaktelitian pengukuran. Pada Gambar 2 dapat diketahui CV sebesar $\leq 2\%$, yang menunjukkan pengukuran dengan metode GC telah memberikan ketelitian dengan validitas tinggi. Ketepatan (K) dapat diungkapkan dengan kesalahan yaitu nilai ketepatan tergantung pada besarnya penyimpangan data dari nilai rata-rata dengan nilai sebenarnya. Pada Gambar 2 juga dapat diketahui K sebesar $\leq 5\%$, hal ini berarti metode GC mempunyai validitas yang tinggi. Validasi parameter akurasi yang lain adalah perolehan kembali, dimana derajat persetujuan antara nilai yang terukur dengan nilai sebenarnya. Pada Gambar 2 juga menunjukkan nilai perolehan kembali yaitu pada rentang 98 – 102%, berarti metode GC memiliki perolehan kembali baik.

Kinerja metode GC untuk aplikasi praktis dalam analisis sampel makanan dan minuman hasil fermentasi ditunjukkan dengan melakukan penentuan kadar alkohol dalam bir, makanan fermentasi tradisional (poteng ambon dan poteng jaje tujak) dan minuman fermentasi tradisional (tuak dan brem). Penentuan kadar etanol sampel makanan fermentasi yang digunakan adalah air yang ada sebagai hasil fermentasi. Kandungan etanol dari sampel diukur dan hasil yang diringkas diberikan pada Tabel 1. Akurasi metode GC digunakan untuk menilai perbandingan dengan hasil yang diberikan oleh produsen bir dan lainnya digunakan untuk memvalidasi metode yang biasa digunakan pada industri rumahan dalam memantau kadar etanol produksinya. Pada industri rumahan dalam menentukan kadar etanol digunakan alkoholmeter. Alkoholmeter atau hidrometer alkohol ini dapat menentukan kadar etanol didasarkan pada berat jenis larutan etanol dan air. Berat jenis etanol berbanding terbalik dengan konsentrasi etanol dalam larutan.

Tabel 1. Kadar etanol dalam sampel makanan dan minuman fermentasi dengan metode GC dan alkoholmeter

Sampel Makanan dan Minuman Fermentasi	Etanol %(V/V)		
	Kadar Tertera	Metode GC	Alkoholmeter
S1- Bir	4,9	5,00±0,5	4,3±0,3
S2- Poteng Ambon	-	0,50±0,7	0,7±0,2
S3- Poteng Jaje Tujak	-	0,45±0,5	0,5±0,2
S4- Tuak	-	25,5±0,2	28±0,5
S5- Brem	-	30,1±0,2	31±0,4

*rerata semua pengukuran dilakukan n=3

Tabel 1 menunjukkan bahwa pada sampel bir antara kadar yang tertera dalam kemasan (*value declared by the producer*) dengan metode GC diperoleh hasil yang tidak berbeda secara signifikan. Hal ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan biosensor berbasis alkohol oksidase terimobilisasi dalam membran polianilin, diperoleh sampel S1 memiliki kadar etanol 4,27±0,03 % (V/V) (Kuswandi et al., 2014). Uji anova digunakan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan metode GC dan alkoholmeter. Hasil uji anova menunjukkan bahwa antara metode GC dan alkoholmeter tidak terdapat perbedaan hasil secara signifikan. Berdasarkan ulasan di atas, maka metode GC dan alkoholmeter dapat digunakan sebagai alternatif yang baik dalam penentuan kadar etanol dalam sampel makanan dan minuman fermentasi sebagai penunjang dalam verifikasi halal produk makanan dan minuman.

KESIMPULAN

Penentuan kadar alkohol metode GC menunjukkan daerah linier pada interval 1-10% dengan nilai koefisien korelasi (r) adalah 0.9984, nilai limit deteksi sebesar 0,15 ng, koefisien variasi (CV) sebesar $\leq 2\%$, ketepatan (K) sebesar $\leq 5\%$ dan perolehan kembali pada rentang 98-102% yang menunjukkan bahwa alat GC mempunyai sensitifitas, ketelitian, validitas dan perolehan kembali yang tinggi. Kadar alkohol pada sampel bir yang tertera dalam kemasan dengan hasil pengukuran GC menunjukkan kesesuaian. Hasil uji anova menunjukkan bahwa antara metode GC dan alkoholmeter tidak berbeda secara signifikan sehingga dapat dijadikan metode alternatif penentuan alkohol dalam makanan dan minuman.

DAFTAR PUSTAKA

Anghelescu, G., N. Mirescu, A. Tănăsescu and F. Grama. 2017. Quantitative determination of ethyl alcohol in blood, by gas chromatography. In *ECAI 2017-*

International Conference on Electronics, Computers and Artificial Intelligence (ECAI) – 9th Edition. Turkey. (pp. 1–5).

- Azevedo, A. M., D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral and L. P. Fonseca. 2005. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 21:235–247.
- Destanoglu, O. and I. Ates. 2019. Determination and evaluation of methanol , ethanol and higher alcohols in legally and illegally produced alcoholic beverages. *Journal of the Turkish Chemical Society Chemistry: A*. 6(1):21–28.
- Frazier, R. A. 2001. Review Recent advances in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 22:4197–4206.
- Fu, C., H. A. O. Liu, S. Fu and X. Chai. 2015. Rapid and simultaneous determination of acetone , butanol and ethanol in butanol fermentation broth by full. *Cellulose Chemistry And Technology*. 49(9–10):813–818.
- Gerogiannaki-Christopoulou, M., N. V. Kyriakidis and P. E. Athanasopoulos. 2003. Strength of Small Volume Samples. *Journal of AOAC International*. 86(6):1232–1235.
- Hönig, V., J. Táborský, M. Orsák and R. Ilves. 2015. Using gas chromatography to determine the amount of alcohols in diesel fuels. *Agronomy Research*, 13(5):1234–1240.
- Ishmayana, S., M. Fadhlillah, Y. Y. Kristia and H. Budiman. 2015. Validation of a modified alcohol dehydrogenase assay for ethanol determination. *Current Chemistry Letters*. 4:77–84.
- Kuswandi, B., T. Irmawati, M. A. Hidayat, and M. Ahmad 2014. A Simple visual ethanol biosensor based on alcohol oxidase immobilized onto polyaniline film for halal verification of fermented beverage samples. *Sensors*. 14:2135–2149.
- Lachenmeier, D. W., R. Godelmann, M. Steiner, B. Ansay, J. Weigel and G. Krieg. 2010. Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor. *Chemistry Central Journal*, 4(5):1–10.
- LPPOM-MUI. 2008. Panduan umum sistem jaminan halal LPPOM – MUI, Lembaga Pengkajian Pangan Obat-Obatan dan Kosmetika Majelis Ulama Indonesia, Jakarta, Halaman 44.
- Moales, D., A. F. Spac, M. Prisecaru and E. Butnaru. 2010. Determining the concentration of alcohol from the natural. *Biologie*. 19:63–71.
- Mohammed, A. H., A. K. Mohammed, F. H. Kamar, A. A. Abbas and G. Nechifor. 2018. Determination of ethanol in fermented broth by headspace gas chromatography using capillary column. *Revista de Chimie-Bucharest*, 69(11):2016–2019.
- Muchtaridi, M., I. Musfiroh, N. N. Hambali and W. Indrayati. 2012. determination of alcohol contents of fermented black tape ketan based on different fermentation time using specific gravity , refractive index and GC-MS method.

Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 2(3):933–946.

- Parpinello, G. P. and A. Versari. 2000. A Simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of glucose, glycerol and methanol in a bioprocess. *Journal of Chromatographic Science*. 38:259–261.
- Rotariu, L., C. Bala and V. Magearu. 2004. New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. *Analytica Chimica Acta*. 513:119–123.
- Sanford, C. L., B. A. Mantooth and B. T. Jones. 2001. Determination of ethanol in alcohol samples using a modular raman spectrometer. *Journal of Chemical Education*. 78(9):1221–1225.
- Sumbhate, S., S. Nayak, D. Goupale, A. Tiwari and R. S. Jadon. 2012. Colorimetric method for the estimation of ethanol in alcoholic-drinks. *Journal of Analytical Techniques*. 1:1–6.
- Tiscione, N. B., I. Alford, D. T. Yeatman and X. Shan. 2011. Ethanol analysis by headspace gas chromatography with simultaneous flame-ionization and mass spectrometry detection. *Journal of Analytical Toxicology*. 35:501–511.
- Wang, M., Y. Choong, N. Su and M. Lee. 2003. A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11(2):133–140.
- Yang, Y., K. Boots and D. Zhang. 2012. A sustainable ethanol distillation system. *Sustainability*. 4:92–105.