



PENGEMBANGAN METODE ALTERNATIF PENGUJIAN ETANOL PADA KEFIR MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI ENZIMATIK

Kartika¹, Jaenal Gopur Asmanul Salam² dan Martina Kuncara³

¹Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknik, Universitas Islam Al-Ihya Kuningan

² Program Studi Informatika, Fakultas Teknik, Universitas Islam Al-Ihya Kuningan

³ Program Studi Teknik Mesin, Fakultas Teknik, Universitas Islam Al-Ihya Kuningan

Email: kartikarofiq@gmail.com , bangzee567@gmail.com dan martinakuncara1@gmail.com

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
Artikel Masuk: 26/08/2026 Artikel Review: 01/09/2026 Artikel Revisi: 14/09/2026	Penetapan kadar etanol diperlukan untuk tujuan kendali mutu, keamanan pangan, serta kepatuhan terhadap regulasi. Saat ini pengukuran kadar etanol menggunakan metode konvensional seperti kromatografi gas (GC) dan destilasi–densimetri walaupun memiliki tingkat akurasi tinggi, namun membutuhkan peralatan mahal, waktu analisis relatif lama, serta tenaga analis terlatih sehingga kurang aplikatif bagi industri kecil dan UMKM pangan fermentasi, seperti produk kefir. Penelitian ini difokuskan untuk mengembangkan metode alternatif pengujian etanol yang sederhana, tervalidasi, dan aplikatif bagi kebutuhan pengendalian mutu UMKM pangan fermentasi. Penelitian ini menggunakan metode spektrofotometri enzimatis untuk menentukan kadar etanol pada kefir. Prinsip analisis didasarkan pada oksidasi etanol menjadi asetaldehid oleh nikotinamida adenin dinukleotida (NAD ⁺) dengan bantuan enzim alkohol dehidrogenase (ADH). Selanjutnya, asetaldehid dioksidasi secara kuantitatif menjadi asam asetat dengan bantuan enzim aldehid dehidrogenase (Al-DH), yang menghasilkan NADH. Pembentukan NADH kemudian diukur berdasarkan nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar etanol pada kefir yang difermentasi selama 28, 32, dan 36 jam masing-masing sebesar 0,000% (v/v), 0,273% (v/v), dan 0,425% (v/v), yang menunjukkan adanya peningkatan kadar etanol seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi.
Kata kunci: Spektrofotometri; enzimatik; etanol; kefir	

Pendahuluan

Kefir merupakan salah satu produk olahan susu fermentasi yang memiliki karakteristik cita rasa asam dengan aroma alkoholik serta menghasilkan sensasi karbonasi. Produk ini berasal dari kawasan Kaukasia dan telah banyak dikonsumsi sebagai minuman fermentasi. Proses produksi kefir berlangsung melalui aktivitas fermentasi berbagai mikroorganisme, terutama bakteri asam laktat dan yeast yang terdapat dalam bibit kefir atau kefir grain. Kefir dapat dibuat dengan memfermentasi susu dari berbagai sumber, seperti sapi, kambing, maupun domba, menggunakan kombinasi bakteri asam laktat dan yeast. Beberapa mikroorganisme yang berperan dalam proses fermentasi kefir antara lain *Lactobacillus* sp. dan *Saccharomyces* sp. (Kartika et al., 2019). Keberadaan alkohol atau etanol sebagai salah satu produk hasil fermentasi tersebut perlu mendapat perhatian, terutama berkaitan dengan aspek keamanan dan kehalalan produk pangan.

Etanol merupakan senyawa penting yang banyak dianalisis dalam bidang pangan, khususnya pada produk dan minuman fermentasi. Penetapan kadar etanol diperlukan untuk tujuan kendali mutu, keamanan pangan, serta kepatuhan terhadap regulasi (Rohman et al. 2012). Metode konvensional seperti kromatografi gas (GC) dan destilasi–densimetri memiliki tingkat akurasi tinggi, namun membutuhkan peralatan mahal, waktu analisis relatif lama, serta tenaga analis terlatih sehingga kurang aplikatif bagi industri kecil dan UMKM pangan fermentasi, seperti produk kefir. Sebagai alternatif, metode spektrofotometri enzimatis berbasis Alcohol Dehydrogenase (ADH) dan biosensor enzimatis telah banyak dilaporkan memiliki keunggulan berupa spesifisitas tinggi, waktu analisis singkat, serta potensi portabilitas (Turner, 2013). Namun, sebagian besar penelitian tersebut masih dilakukan pada minuman komersial dan skala laboratorium, serta belum diarahkan secara spesifik pada matriks pangan fermentasi tradisional yang memiliki kompleksitas tinggi. Berdasarkan permasalahan tersebut, penelitian ini diarahkan untuk mengisi kesenjangan penelitian melalui pengembangan metode alternatif untuk penentuan kadar etanol yang sederhana, tervalidasi, serta aplikatif dalam mendukung pengendalian mutu produk pangan fermentasi, khususnya pada skala Usaha Mikro, Kecil, dan Menengah (UMKM). Hasil analisis menggunakan metode spektrofotometri enzimatis selanjutnya dibandingkan dengan metode *Gas Chromatography* (GC) sebagai metode pembandingan, serta diverifikasi terhadap hasil pengukuran kadar etanol menggunakan alkoholmeter yang umum digunakan pada industri pangan rumahan. Pengembangan dan penerapan metode spektrofotometri enzimatis untuk penentuan kadar etanol diharapkan dapat menyediakan informasi analitis yang lebih objektif mengenai keberadaan dan kadar etanol pada produk pangan dan minuman hasil fermentasi. Informasi tersebut dapat menjadi salah satu data pendukung dalam proses penilaian dan pemenuhan persyaratan kehalalan produk, sehingga dapat memberikan kepastian dan mengurangi keraguan konsumen Muslim dalam mengonsumsi produk pangan fermentasi.

Metode Penelitian

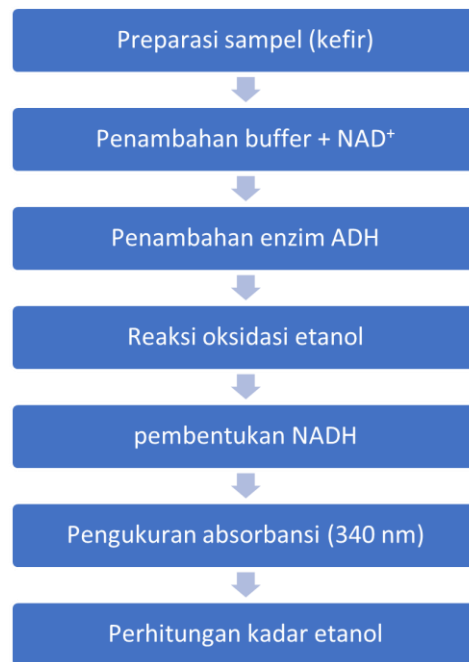
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pengolahan Pangan dan Laboratorium Kimia Pangan, Universitas Islam Al-Ihya Kuningan. Analisis Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen, Universitas Pendidikan Indonesia. Penelitian dilaksanakan selama periode Mei hingga Juli 2026.

1. Pembuatan Kefir

Pembuatan kefir mengacu pada metode yang dilaporkan oleh Kartika et al. (2022). Sebanyak 1 L susu sapi segar dipasteurisasi pada suhu 90–95 °C selama 5–10 menit. Setelah proses pasteurisasi, susu didinginkan pada suhu ruang hingga mencapai suhu 25 °C. Selanjutnya, kefir grain ditambahkan sebanyak 5% (b/v). Campuran kemudian diinkubasi pada suhu ruang (20–25 °C) selama tiga variasi waktu fermentasi, yaitu 28, 32, dan 36 jam.

2. Pengujian kadar etanol

Metodologi penelitian mengacu pada prinsip pengembangan metode enzimatis dan biosensor elektrokimia yang telah dilaporkan sebelumnya (Turner, 2013, Kumar *et al.* 2016), dengan modifikasi agar sesuai untuk matriks pangan fermentasi. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim Alcohol Dehydrogenase (ADH), koenzim NAD⁺, chitosan, asam asetat, etanol absolut (99%, Merck), gluatraldehide, aquades, kefir, buffer fosfat. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Vis, kuvet kuarsa (340 nm), mikro pipet, tip, vortex, peralatan gelas. Pengembangan metode alternatif pengujian etanol pada kefir menggunakan spektrofotometri enzimatis dijelaskan pada diagram alir berikut (Krieger *et al.* 2018):



Gambar 1. Diagram alir metode spektrofotometri enzimatik

3. Metode dan Parameter Validasi

Validasi metode dilakukan mengacu pada pedoman ICH Q2(R1) dan AOAC *Official Methods* (Rohman et al. 2012, ICH 2005), untuk memastikan metode yang dikembangkan memenuhi kriteria analitik yang dapat diterima. Parameter validasi meliputi:

- 1) Akurasi, ditentukan melalui uji recovery dengan kriteria penerimaan 80–120%.
- 2) Presisi, ditentukan dari pengulangan pengukuran minimal enam kali ($n \geq 6$) dengan kriteria $RSD \leq 5\%$.
- 3) Linearitas, ditentukan dari kurva kalibrasi dengan koefisien korelasi ($r \geq 0,99$).
- 4) Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ) dihitung berdasarkan simpangan baku respon dan kemiringan kurva kalibrasi.
- 5) Penetapan kriteria penerimaan ini dimaksudkan untuk memastikan bahwa metode alternatif yang dikembangkan layak digunakan sebagai metode uji pendamping metode konvensional.

Presisi

Presisi ditentukan melalui pengulangan pengukuran ($n \geq 6$) pada konsentrasi tertentu. Rumus:

$$RSD (\%) = (SD / \text{Rata-rata}) \times 100\%$$

Kriteria penerimaan: $RSD \leq 5\%$.

Linearitas

Linearitas dievaluasi dengan kurva kalibrasi etanol pada berbagai konsentrasi.

Kriteria penerimaan: Koefisien korelasi ($r \geq 0,99$)

Limit of Detection (LOD)

$$LOD = 3,3 \times (SD / \text{slope})$$

Limit of Quantification (LOQ)

$$LOQ = 10 \times (SD / \text{slope})$$

Keterangan:

SD = simpangan baku respon

slope = kemiringan kurva kalibrasi

Data yang diperoleh dari setiap perlakuan dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh faktor perlakuan terhadap respon yang diamati. Apabila hasil ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antarperlakuan, analisis dilanjutkan dengan uji Duncan untuk menentukan perbedaan antar kelompok perlakuan. Seluruh analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak SAS versi 9.4 dan Microsoft Excel 2021.

Hasil dan Pembahasan

Etanol dapat dihasilkan melalui proses fermentasi bahan yang mengandung karbohidrat dengan memanfaatkan aktivitas mikroorganisme. Salah satu mikroorganisme yang umum digunakan dalam proses fermentasi etanol adalah khamir *Saccharomyces cerevisiae*. Pembentukan etanol oleh *S. cerevisiae* berlangsung melalui serangkaian reaksi enzimatik yang melibatkan berbagai enzim dalam mengonversi glukosa menjadi etanol (Hermansyah & Novia, 2014). Keberadaan *S. cerevisiae* dalam kefir grain berperan dalam pembentukan etanol selama proses fermentasi susu, termasuk pada produk kefir. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar etanol pada kefir susu sapi secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis.

Metode spektrofotometri enzimatik dipilih karena memiliki keunggulan dari aspek keamanan dibandingkan metode spektrofotometri yang menggunakan proses oksidasi distilat dengan dikromat. Metode berbasis dikromat membutuhkan volume sampel lebih dari 5 mL dan menggunakan reagen yang bersifat toksik serta termasuk dalam bahan kimia yang penggunaannya perlu dikendalikan (Hermanto et al., 2020). Analisis etanol secara enzimatik atau *enzymatic bioanalysis* didasarkan pada serangkaian reaksi oksidasi yang melibatkan koenzim nikotinamida adenin dinukleotida (NAD^+) dan enzim alkohol dehidrogenase (ADH).

Pada tahap pertama, etanol dioksidasi menjadi asetaldehid dengan bantuan enzim ADH, sedangkan NAD^+ direduksi menjadi NADH. Kesetimbangan reaksi oksidasi etanol pada kondisi awal cenderung berada pada sisi etanol dan NAD^+ . Namun, kesetimbangan tersebut dapat digeser ke arah pembentukan asetaldehid, NADH, dan H^+ dengan mengondisikan reaksi pada suasana basa serta mengikat atau menghilangkan asetaldehid yang terbentuk. Selanjutnya, asetaldehid dioksidasi secara kuantitatif menjadi asam asetat dengan bantuan enzim aldehid dehidrogenase (Al-DH), yang menghasilkan NADH. Jumlah NADH yang terbentuk kemudian ditentukan berdasarkan nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 334, 340, atau 365 nm. NAD^+ merupakan koenzim yang mengandung gugus nikotinamida dan berperan sebagai pembawa atom hidrogen serta elektron dalam berbagai reaksi oksidasi-reduksi (Berg et al., 2001).

Tahap awal validasi metode dilakukan melalui pembuatan kurva baku untuk mengevaluasi linearitas hubungan antara konsentrasi etanol dan respons analitik yang dihasilkan oleh metode. Larutan standar etanol absolut dibuat pada konsentrasi 1, 2, 5, 8, dan 10% (v/v), kemudian masing-masing larutan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh persamaan kurva baku dengan nilai kemiringan (*slope*, *b*) sebesar $-0,6759$, intersep (*a*) sebesar $0,8573$, dan koefisien determinasi (R^2) sebesar $0,9954$. Nilai tersebut menunjukkan adanya hubungan linear yang sangat kuat antara konsentrasi etanol dan respons absorbansi. Hasil ini menunjukkan bahwa kurva baku memiliki linearitas yang baik karena nilai R^2 mendekati 1.

Parameter validasi berikutnya adalah presisi yang bertujuan untuk mengevaluasi tingkat kedekatan hasil pengukuran yang diperoleh dari pengulangan analisis. Presisi dinyatakan melalui nilai *standard deviation* (SD) dan *relative standard deviation* (RSD). Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh nilai SD sebesar $0,01019$ dan RSD sebesar $1,7968\%$. Nilai RSD yang berada di bawah 2% menunjukkan bahwa metode memiliki tingkat presisi yang baik. Dengan demikian, metode spektrofotometri yang digunakan menunjukkan keterulangan hasil pengukuran yang memadai untuk penetapan kadar etanol.

Selanjutnya, dilakukan evaluasi terhadap batas deteksi (*limit of detection*, LOD) dan batas kuantifikasi (*limit of quantification*, LOQ). LOD digunakan untuk menunjukkan konsentrasi analit terendah yang masih dapat terdeteksi oleh metode, sedangkan LOQ menunjukkan konsentrasi analit terendah yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dengan tingkat ketelitian dan ketepatan yang dapat diterima. Berdasarkan hasil

perhitungan, diperoleh nilai LOD sebesar 0,04973% (v/v) dan LOQ sebesar 0,15070% (v/v). Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode spektrofotometri UV-Vis mampu mendeteksi etanol pada konsentrasi serendah 0,04973% (v/v), sedangkan konsentrasi etanol sebesar 0,15070% (v/v) merupakan batas terendah yang masih dapat diidentifikasi menggunakan metode tersebut.

Parameter validasi selanjutnya adalah akurasi yang bertujuan untuk mengetahui tingkat kedekatan antara hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali (*recovery*). Pengujian akurasi dilakukan menggunakan metode adisi, yaitu dengan menambahkan sejumlah analit atau standar ke dalam sampel yang telah diketahui konsentrasinya, kemudian campuran tersebut dianalisis kembali. Berdasarkan hasil pengukuran, diperoleh nilai *recovery* sebesar 99,90%. Nilai tersebut menunjukkan tingkat akurasi yang sangat baik karena berada dalam rentang penerimaan 80–120% (Putra, 2012). Dengan demikian, metode spektrofotometri UV-Vis yang digunakan memiliki akurasi yang memadai untuk penetapan kadar etanol pada sampel kefir.

Berdasarkan hasil analisis kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri enzimatis, diperoleh kadar etanol pada sampel kefir susu sapi sebagaimana disajikan pada Tabel 1. Selanjutnya, hasil penetapan kadar etanol menggunakan metode spektrofotometri enzimatis dibandingkan dengan hasil analisis menggunakan metode *Gas Chromatography* (GC). Selain itu, hasil pengukuran juga diverifikasi terhadap penentuan kadar etanol yang dilakukan pada skala industri rumah tangga menggunakan alkoholmeter. Perbandingan tersebut dilakukan untuk mengevaluasi kesesuaian hasil pengukuran metode spektrofotometri enzimatis dengan metode analisis pembanding dan metode yang umum digunakan pada industri rumah tangga.

Tabel 1. Kadar etanol kefir dengan berbagai metode pengukuran

Metode	Etanol % (V/V)		
	28 jam (Mean ± SD)	32 jam (Mean ± SD)	36 jam (Mean ± SD)
Spektrofotometer	0,000 ± 0,000 _a	0,273 ± 0,004 _b	0,425 ± 0,013 _c
GC-MS	0,000 ± 0,000 _a	0,277 ± 0,004 _b	0,451 ± 0,010 _c
Alkoholmeter	0,000 ± 0,000 _a	0,267 ± 0,058 _b	0,400 ± 0,100 _c

Hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa lama fermentasi memberikan pengaruh yang sangat signifikan terhadap kandungan etanol pada kefir. Pada fermentasi selama 28 jam, etanol belum terdeteksi pada sampel berdasarkan seluruh metode analisis yang digunakan. Namun, seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi, kandungan etanol pada kefir menunjukkan kecenderungan peningkatan. Peningkatan tersebut menunjukkan bahwa semakin lama proses fermentasi berlangsung, semakin besar peluang terbentuknya etanol sebagai salah satu produk metabolisme mikroorganisme yang berperan dalam fermentasi kefir.

Analisis ANOVA selanjutnya dilakukan untuk membandingkan hasil penetapan kadar etanol menggunakan metode spektrofotometri enzimatis, *Gas Chromatography* (GC), dan alkoholmeter. Hasil analisis menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil pengukuran kadar etanol yang diperoleh dari ketiga metode tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penetapan kadar etanol menggunakan spektrofotometri enzimatis memiliki kesesuaian yang baik dengan hasil yang diperoleh menggunakan GC dan alkoholmeter pada kondisi penelitian yang dilakukan.

Berdasarkan hasil tersebut, metode spektrofotometri enzimatis berpotensi digunakan sebagai metode alternatif dalam penentuan kadar etanol pada produk pangan dan minuman fermentasi. Metode ini dapat menjadi salah satu pendekatan analitis yang mendukung pengendalian mutu serta menyediakan data mengenai kandungan etanol yang dapat digunakan sebagai informasi pendukung dalam proses verifikasi persyaratan kehalalan produk pangan dan minuman fermentasi.

Kesimpulan

Pada penentuan kadar etanol menggunakan metode spektrofotometri enzimatis, diperoleh nilai kemiringan (slope, b) sebesar $-0,6759$ dan intersep (a) sebesar $0,8573$, dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar $0,9954$. Nilai R^2 yang mendekati 1 menunjukkan adanya hubungan linear yang sangat kuat antara konsentrasi etanol dan respons absorbansi, sehingga metode spektrofotometri enzimatis menunjukkan linearitas yang baik. Hasil pengujian validasi menunjukkan bahwa metode tersebut memiliki kinerja analitis yang baik berdasarkan parameter validasi yang digunakan.

Hasil analisis ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil penentuan kadar etanol menggunakan metode spektrofotometri enzimatis, Gas Chromatography (GC), dan alkoholmeter. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga metode menghasilkan nilai pengukuran yang secara statistik tidak berbeda signifikan pada kondisi penelitian. Dengan demikian, metode spektrofotometri enzimatis berpotensi digunakan sebagai metode alternatif dalam penentuan kadar etanol pada produk makanan dan minuman fermentasi.

Bibliografi

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2001, Biochemistry, Fifth Edition, W.H., Freeman and company, Newyork.
- Hermansyah, & Novia. (2014). *PENENTUAN KADAR ETANOL HASIL FERMENTASI SECARA ENZIMATIS*.
- Hermanto, D., Andayani, I. G. A. S., Honiar, R., Shofiyana, L. M., & Ismillayli, N. (2020). Penentuan Kandungan Etanol dalam Makanan dan Minuman Fermentasi Tradisional Menggunakan Metode Kromatografi Gas. *CHEMPUBLISH JOURNAL*, 5(2), 105–115. <https://doi.org/10.22437/chp.v5i2.8979>
- ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Geneva: International Council for Harmonisation; 2005.
- Kartika, Kusumastuti, I., & Annisa Syadiah, E. (2022). KARAKTERISTIK DAN DAYA TERIMA KEFIR SINBIOTIK TEPUNG GEMBILI (*Dioscorea esculenta*) MODIFIKASI FISIK. *J.Gipas*, 6(1), 51–64. <http://jos.unsoed.ac.id/index.php/jgps>
- Kartika, Rahayuningsih, M., & Setyaningsih, D. (2019). KARAKTERISTIK KEFIR DENGAN PENAMBAHAN PUREE UMBI GEMBILI. <http://ejournal.upi.edu/index.php/edufortech/index>
- Krieger S, Müller M, Fischer K. Enzymatic determination of ethanol in beverages using alcohol dehydrogenase. *Food Chem.* 2018;252:95–102.
- Kumar H, Neelam R. Enzyme-based biosensors for ethanol detection. *Biosens J.* 2016;5(2):1–7.
- Rohman A, Che Man YB. Analysis of ethanol in food products: a review. *Food Anal Methods.* 2012;5:144–156.
- Putra, A. (2012). Pengaruh Alkohol Terhadap Kesehatan. *Semnas FMIPA UNDIKSHA*, 17–24.
- Turner, A. P. F. (2013). Biosensors: Sense and sensibility. *Chemical Society Reviews*, 42(8), 3184–3196. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>