

KK
KKB
LP. 12/12
Pur
0

LAPORAN PENELITIAN FUNDAMENTAL
Tahun Anggaran 2011



**OPTIMASI METODE PENETAPAN KADAR METABOLIT
BENZENA DALAM URIN MENGGUNAKAN *HIGH
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)***

Oleh :

Djoko Agus Purwanto.
Riesta Primaharinastiti
Febri Annuryanti

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan Surat Keputusan Rektor tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun Pengabdian Kepada Masyarakat Mono Tahun dan Pengabdian Kepada Masyarakat Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2011 Nomor : 844/H3/KR/2011
Tanggal 20 April 2011

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
2011

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

1.	Judul Penelitian	:	Optimasi Metode Penetapan Kadar Metabolit Benzena dalam Urine Menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
2.	Ketua Peneliti		
	a. Nama Lengkap	:	Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi.
	b. Jenis Kelamin	:	L
	c. NIP	:	19590805 19870 1 1001
	d. Pangkat/Golongan	:	Pembina/IVa
	e. Jabatan	:	Lektor Kepala
	f. Jurusan/Fakultas	:	Kimia Farmasi / Farmasi
	g. Perguruan Tinggi	:	Universitas Airlangga
	h. Pusat Penelitian	:	LPPM Universitas Airlangga
3.	Jumlah Tim Peneliti	:	2 orang
4.	Lokasi Penelitian	:	Laboratorium Analisis Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
5.	Kerjasama dengan institusi lain	:	
	• Nama Instansi	:	-
	• Alamat	:	-
6.	Masa Penelitian	:	10 bulan
7.	Biaya yang diperlukan	:	Rp. 40.000.000,00 (Empat puluh juta rupiah)

Mengetahui,
Dekan,



Dr. Hj. Umi Athijah, MS., Apt.
NIP. 19560407 198103 2 001

Surabaya, 27 Oktober 2011
Ketua Peneliti,

Dr. Djoko Agus P, Apt., MSi.
NIP. 19590805 19870 1 1001



Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian,

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi.
NIP. 19590805 19870 1 1001

RINGKASAN

Penelitian diawali dengan mengembangkan metode HPLC agar dapat digunakan untuk analisis metabolit benzena dalam sampel urin manusia. Metode yang dikembangkan kemudian divalidasi untuk membuktikan bahwa metode tersebut *reliable* dan *reproducible*. Setelah tervalidasi, metode diaplikasikan dalam sampel urin manusia yang terpapar dengan benzena. Biomarker yang digunakan dalam sampel ini adalah *s-phenylmercapturic acid* atau SPMA.

Proses analisis diawali dengan tahap preparasi sampel yang melibatkan ekstraksi cair-cair. Pelarut pengekstraksi yang digunakan adalah etil asetat sebanyak 3,0 ml dan ekstraksi dilakukan 2 kali.

Optimasi kondisi kromatografi dilakukan untuk memperoleh kondisi kromatografi yang dapat memisahkan analit SPMA dari internal standar asam benzoat atau komponen lain yang mungkin terdapat dalam sampel urin. Dari tahap optimasi diperoleh bahwa dengan kolom Hypersil ODS (4,0 x 125 x 5 μ m) pada suhu kolom 25°C dan panjang gelombang deteksi 205 nm, pemisahan optimal diperoleh dengan menggunakan eluasi sistem gradien.

Validasi metode analisis merupakan tahap penting dalam suatu proses analisis karena bertujuan untuk membuktikan bahwa metode analisis yang dikembangkan telah memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan metode analisis HPLC untuk analisis SPMA dalam urin telah memenuhi persyaratan validasi metode analisis. Linieritas ditunjukkan dari persamaan regresi $y = 23,96x - 0,002$ dengan koefisien regresi $r = 0,994$. Sedangkan perolehan kembali dengan metode tersebut adalah 88,34-117,16% dengan rerata 102,82% dan KV =10,37%.

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala nikmat dan karuniaNya yang telah dilimpahkan kepada kami, sehingga hanya dengan rahmat dan kasihNya kami dapat menyelesaikan penelitian ini.

Penelitian dengan judul "Optimasi Metode Penetapan Kadar Metabolit Benzena Dalam Urin Menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC)" dapat terselesaikan berkat bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu pada kesempatan ini kami ingin menyampaikan rasa terima kasih yang setinggi-tingginya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. H. Fasich, Apt. atas kesempatan untuk memperoleh pendanaan penelitian melalui Hibah Fundamental tahun anggaran 2011.

Dekan Fakultas Farmasi Dr. Umi Atijah, MS yang telah mendukung, memberikan kesempatan dan semua fasilitas yang dapat kami pergunakan untuk menyelesaikan penelitian ini.

Ketua Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bantuan dan kerjasama selama menyelesaikan penelitian ini.

Para analis dan laboran Ruang Praktikum Analisis Farmasi dan Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas semua bantuannya selama penelitian ini.

Akhirnya kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dalam segala hal hingga terselesainya penelitian ini.

Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan semoga Allah meridhoinya. Amien ya Rabbal alamin.

Surabaya, 27 Oktober 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Pengesahan	i
Ringkasan	ii
Abstrak	iii
Prakata	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Balakang	1
1.2. Rumusan Masalah	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Kromatografi	3
2.2. Benzena	4
2.3. Metode Analisis Untuk Penentuan Metabolit Benzena	5
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	6
3.1. Tujuan Penelitian	6
3.2. Manfaat Penelitian	6
BAB IV. METODE PENELITIAN	7
4.1. Alat	7
4.2. Bahan	7
4.3. Tahapan Penelitian	7
4.3.1. Optimasi Kondisi Kromatografi	7
4.3.2. Validasi Metode Analisis	7
4.4. Preparasi Sampel Urin	9
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	10
5.1. Optimasi Kondisi Kromatografi	10
5.2. Validasi Metode Analisis	12

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	16
6.1. Kesimpulan	16
6.2. Saran	16
 DAFTAR PUSTAKA	 17

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1. Komposisi Eluen dengan Sistem Gradien untuk Analisis Metabolit Benzena dalam Urin	10
Tabel 5.2. Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi SPMA dengan Internal Standar Asam Benzoat.....	12
Tabel 5.3. Hasil Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi..	13
Tabel 5.4. Hasil Analisis Perolehan Kembali SPMA dari Sampel Urin.....	14

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Mekanisme Metabolisme Benzena.....	4
Gambar 5.1. Kromatogram Blanko Pelarut Air.....	11
Gambar 5.2. Kromatogram Standar SPMA 5 ppm	11
Gambar 5.3. Kurva Kalibrasi SPMA.....	12
Gambar 5.4. Kromatogram Sampel Urin Tanpa Adisi Standar	14
Gambar 5.5. Kromatogram Sampel Urin Yang Telah Diadisi Standar SPMA 5 ppm.....	14

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Benzena merupakan senyawa kimia penting yang digunakan dalam berbagai proses di industri. Akan tetapi, benzena juga memiliki potensi sebagai karsinogenik. Beberapa studi yang menunjukkan hubungan antara benzena dengan leukemia telah dikemukakan (Synder, 1996 dan Guenel *et al*, 2002). Efek samping lain dari benzena diantaranya adalah depresi terhadap sumsum tulang dan leukemogenesis yang disebabkan oleh kerusakan beberapa kelas sel hematopoietik dan berbagai fungsi sel hematopoietik (Irons *et al*, 1996).

Lingkungan atau paparan terhadap benzena dapat menyebabkan penumpukan benzena di dalam tubuh. Sumber utama benzena diantaranya adalah asap knalpot kendaraan bermotor serta penguapan benzena selama penanganan, distribusi dan penyimpanan bensin. Orang-orang yang berpotensi mempunyai kadar benzena tinggi dalam tubuhnya adalah polisi patroli jalan raya, pegawai pom bensin serta pegawai kilang perminyakan yang bersentuhan langsung dengan minyak bumi. Paparan yang terus menerus terhadap benzena dapat meningkatkan kemungkinan untuk terserang penyakit kanker. Oleh karena itu, analisis metabolit benzena dalam urin manusia yang terpapar benzena dapat bermanfaat dalam deteksi dini penyakit kanker dan juga sebagai acuan dalam melakukan minimalisasi kontak dengan benzena misalnya dengan mengadakan *training safety* mengenai bahaya paparan benzena dan pentingnya penggunaan masker dan sarung tangan bagi mereka yang kontak langsung dengan benzena.

Pada praktiknya, analisis metabolit benzena tidaklah mudah. Selain karena memang kadarnya yang sangat kecil adalah juga karena metabolit berada pada matriks biologis yang sangat kompleks. Untuk itu diperlukan metode analisis yang selektif dan sensitif untuk dapat mendeteksi metabolit tersebut. Metode analisis perlu untuk divalidasi terlebih dahulu

agar dapat diaplikasikan pada analisis rutin. Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa metode analisis tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter yang diuji adalah selektivitas, linieritas, batas deteksi dan kuantitasi, akurasi dan presisi.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi dan validasi metode analisis HPLC untuk menentukan metabolit benzena, dalam hal ini adalah SPMA, dalam sampel urin.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Bagaimanakah komposisi eluen yang optimal untuk analisis SPMA dalam urin dengan metode HPLC?
2. Apakah metode HPLC untuk analisis SPMA dalam urin memenuhi parameter validasi metode analisis?

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran yang berdasar pada perbedaan migrasi masing-masing analit senyawa pada fase diam di bawah pengaruh pergerakan fase gerak. Dasar pemisahan kromatografi adalah terjadinya perubahan dari sistem kesetimbangan distribusi statik molekul senyawa ke sistem kesetimbangan distribusi dinamik di antara fase diam dan fase gerak yang berkesinambungan. Karena setiap molekul analit pada suatu kondisi variabel kromatografi tertentu mempunyai tetapan kesetimbangan distribusi dinamik yang khas, maka akan terjadi pola pemisahan yang tetap. (Mulya, 1995).

Beberapa keuntungan teknik kromatografi sehingga banyak digunakan dalam penelitian maupun pekerjaan analisis adalah : kromatografi merupakan suatu proses berlipat ganda artinya selama analisis terjadi berulang kali kontak adsorpsi dan partisi analit yang dipisahkan, jangkauan analisis baik kualitatif maupun kuantitatif sangat luas dari rentang kadar yang sangat tinggi sampai kadar yang sangat rendah, dapat dilaksanakan dengan mudah dan cepat, diperlukan operator ahli, dapat dilakukan pada suhu kamar, detektornya bervariasi, ketelitian dan ketepatan yang tinggi.

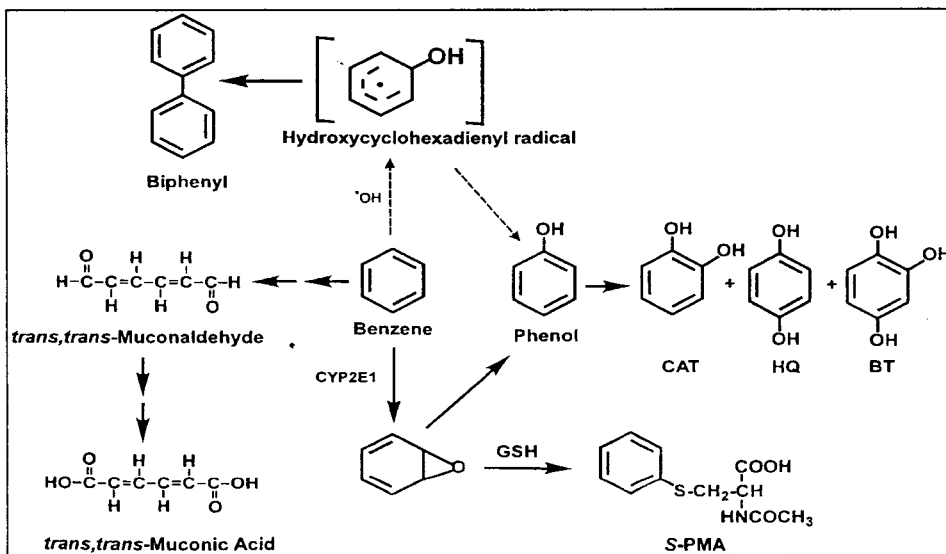
Asas pemisahan pada kromatografi dapat dibedakan : adsorpsi, partisi, pasangan ion, penukar ion, eksklusi ukuran, dan afinitas. Kecepatan migrasi analit melalui fase diam ditentukan oleh perbandingan distribusi (D) dan nilai D ditentukan oleh afinitas relatif analit pada kedua fase. Analit akan terelusi menurut perbandingan distribusi, jika perbedaan perbandingan distribusi analit cukup besar maka campuran analit akan mudah dipisahkan. Analit yang mengalami proses pemisahan di dalam kolom kromatografi dikarakterisasi dengan waktu retensi (t_R) dan factor retensi (k') yang berbanding lurus dengan nilai D . Waktu retensi

merupakan lamanya waktu yang dibutuhkan analit untuk melewati kolom. (Rohman, 2007).

Kromatografi dapat digunakan untuk tujuan analisis kualitatif maupun kuantitatif. Untuk analisis kualitatif dapat dilakukan dengan 3 macam pendekatan yaitu menggunakan perbandingan data retensi analit dengan senyawa baku yang sesuai pada kondisi yang sama; menggunakan cara *spiking* (menambah sampel yang mengandung analit dengan senyawa baku), menggunakan detektor spektrometer massa. (Rohman, 2007).

2.2. Benzena

Benzena adalah polutan lingkungan yang biasa dihasilkan oleh industri kimia. Benzena digunakan dalam proses pembuatan beberapa produk dan juga merupakan konstituen dalam tembakau dan bahan bakar. Intake benzena dari ambient udara di USA adalah 430-1530µg/hari. Pada negara yang sedang berkembang konsentrasi ini dapat meningkat 10 kali lipat. Metabolit utama benzena adalah fenol, hidrokuinon, katekol dan 1,2,4-benzenatriol, *t,t-muconaldehide*, *t,t-muconic acid*. Benzena oksida dapat bereaksi lebih lanjut dengan glutation yang diekskresikan melalui urin sebagai *s-phenylmercapturic acid*. (Melikian et al, 1999)



Gambar 2.1. Mekanisme Metabolisme Benzena

Orang-orang yang berpotensi mempunyai kadar benzena tinggi dalam tubuhnya adalah polisi patroli jalan raya, pegawai pom bensin serta pegawai kilang perminyakan yang bersentuhan langsung dengan minyak bumi. Paparan yang terus menerus terhadap benzena dapat meningkatkan kemungkinan untuk terserang penyakit kanker. Oleh karena itu, analisis metabolit benzena dalam urine manusia yang terpapar benzena dapat bermanfaat dalam deteksi dini penyakit kanker dan juga sebagai acuan dalam melakukan minimalisasi kontak dengan benzena misalnya dengan mengadakan training safety mengenai bahaya paparan benzena dan pentingnya penggunaan masker dan sarung tangan bagi mereka yang kontak langsung dengan benzena.

2.3. Metode Analisis Untuk Penentuan Metabolit Benzena

Berdasarkan penelitian Wiwanitkit *et al* (2001) analisis biomarker *t,t-muconic acid* yang dilakukan menggunakan metode HPLC memerlukan tahapan preparasi yang cukup panjang sebelum akhirnya sampel siap untuk dianalisis. Tahapan preparasinya yakni pencampuran sampel dengan larutan dapar tris-HCl pH 10 yang mengandung asam vanilat sebagai standar, kemudian larutan diperkolasi melalui kolom ion-exchange yang akan dikondisikan dengan menggunakan larutan asam phosphate, dapar asetat serta air de-ionisasi. Proses yang bertahap ini membutuhkan waktu yang cukup lama sehingga hasil analisis sampel tidak dapat segera diketahui. Metode ini agak kurang menguntungkan apabila diterapkan pada sampel dengan jumlah banyak.

Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Bahrami *et al* (2006) metode analisis yang digunakan untuk mendeteksi *s-phenylmercapturic acid* atau SPMA adalah ELISA yang telah divalidasi dengan menggunakan data korelasi GC/MS. Penggunaan ELISA sebagai metode analisis tentunya membutuhkan biaya yang tidak sedikit. Pada penelitian lainnya, metode yang umum digunakan untuk analisis *s-phenylmercapturic acid* adalah GC/MS.

III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. TUJUAN PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Melakukan optimasi kondisi kromatografi pada analisis metabolit benzena, dalam hal ini adalah *s-phenylmercapturic acid* atau SPMA dalam urin menggunakan metode HPLC.
2. Melakukan proses validasi metode HPLC untuk analisis metabolit benzena *s-phenylmercapturic acid* atau SPMA dalam urin .

3.2. MANFAAT PENELITIAN

Diperoleh metode analisis yang akurat, mudah dan terpercaya untuk analisis metabolit benzena *s-phenylmercapturic acid* dalam urin dan hanya membutuhkan waktu analisis yang singkat.

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Alat

HPLC 1100 HP lengkap dengan detektor DAD,
Kolom Hypersil ODS 125 x 4 mmID, 5 μ m
Alat gelas yang biasa digunakan dalam analisis

4.2. Bahan

s-phenylmercapturic acid p.a./SPMA (TIC)

Metanol pro HPLC

KH_2PO_4 p.a

H_3PO_4 pa

Aquabidestilata

Etil asetat p.a

Asam benzoat p.a

4.3. Tahapan Penelitian

4.3.1. Optimasi Kondisi Kromatografi :

Jenis Kolom	: Hypersil ODS RP C-18 (4,0x125x5 μ m)
Suhu kolom	: 25 $^{\circ}\text{C}$
Eluen	: Metanol : dapar fosfat pH 3.0, dengan sistem gradien
Internal standar	: Asam benzoat.

4.3.2. Validasi metode

a. Selektivitas

Selektivitas menunjukkan kemampuan sistem kromatografi melakukan pemisahan terhadap analit dalam sampel dari komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas dianggap baik berdasarkan nilai parameter resolusi (R_s) $\geq 1,5$.

b. Uji LOD / LOQ

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas, sedangkan batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas analit terkecil dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi. Batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali sehingga diketahui simpangan baku respon blanko. (Harmita, 2004). Rumus berikut dapat digunakan dalam perhitungan :

$$Q = \frac{k \cdot S_b}{SI}$$

Dimana : Q = batas deteksi (LOD) atau batas kuantitasi (LOQ)

k = 3 untuk LOD dan 10 untuk LOQ

S_b = simpangan baku respon blanko

SI = slope persamaan garis regresi $y = bx + a$

Batas deteksi dan kuantitasi dapat pula dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi, dengan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (S_{y/x}).

$$S(y/x)^2 = \frac{\sum (y - y_i)^2}{N - 2}$$

c. Uji linieritas

Uji linieritas dilakukan dengan membuat larutan baku kerja *s-phenylmercapturic acid* dengan konsentrasi 0,5; 1; 3; 5; dan 7 ppm dan dianalisis dengan HPLC. Dibuat kurva kalibrasi dan dihitung harga koefisien regresi r.

d. Uji akurasi (perolehan kembali)

Uji akurasi dilakukan dengan membuat larutan baku kerja *s-phenylmercapturic acid* dengan konsentrasi 5 ppm kemudian diadiskan/ditambahkan ke dalam sampel urin dan direplikasi sebanyak 6 kali. Area kromatogram yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear sehingga didapat perolehan kembali. Untuk sampel biologis nilai % perolehan kembali/%recovery yang dapat diterima adalah $\leq 80\%$.

e. Uji presisi

Uji presisi diperoleh dari data hasil recovery, ditentukan dari harga $KV < 20\%$ menurut persyaratan presisi untuk sampel matriks biologis.

4.4. Preparasi sampel urin

Sampel urin dipipet 3,0 mL dan diasamkan dengan menggunakan H_2SO_4 18N hingga pH 1,0, setelah 10 menit ditambah dengan larutan KOH 10N sebanyak 0,2 ml sampai pH 1-2. Sampel diekstraksi menggunakan etil asetat 3.0 ml sebanyak 2 kali dengan cara divortex selama 0,5 menit, kemudian disentrifuse 5000 rpm selama 0,5 menit. Dipisahkan fase etil asetat. Hasil ekstraksi dikeringkan dengan gas nitrogen sampai kering. Residu ditambah dengan 0.5 ml air, diultrasonik 1 menit dan disaring menggunakan kertas saring Whatman 0.22 μm . Sampel siap disuntikkan ke dalam sistem HPLC.

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Optimasi Kondisi Kromatografi

Hasil optimasi kondisi kromatografi diperoleh kondisi optimal sbb :

Suhu Kolom : 25 °C

Panjang gelombang : 205 nm

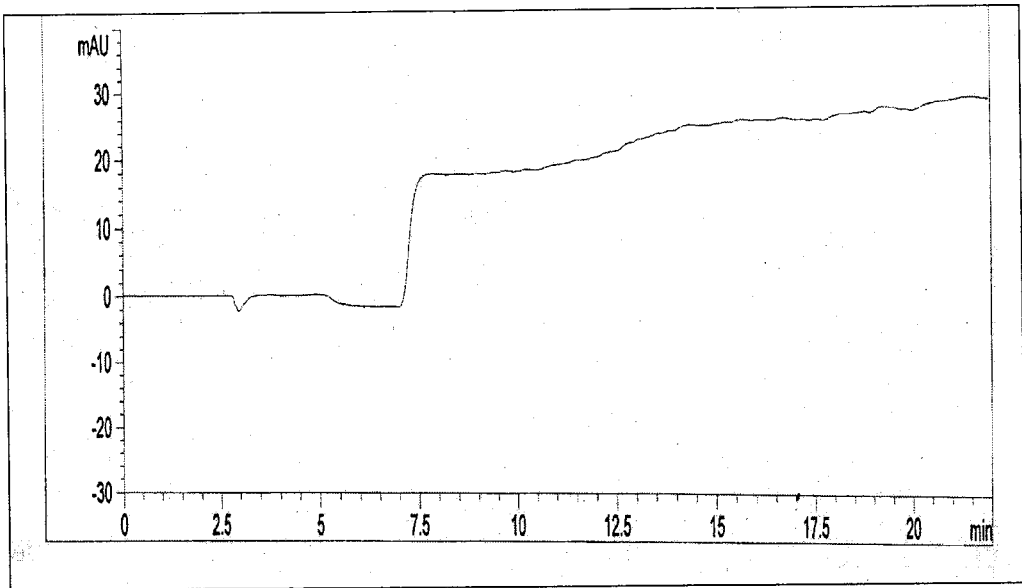
Eluen yang digunakan adalah campuran eluen dengan komposisi metanol : dapar fosfat pH 3.0 dengan sistem gradien sebagai berikut :

Tabel 5.1. Komposisi Eluen dengan Sistem Gradien untuk Analisis Metabolit Benzena dalam Urin

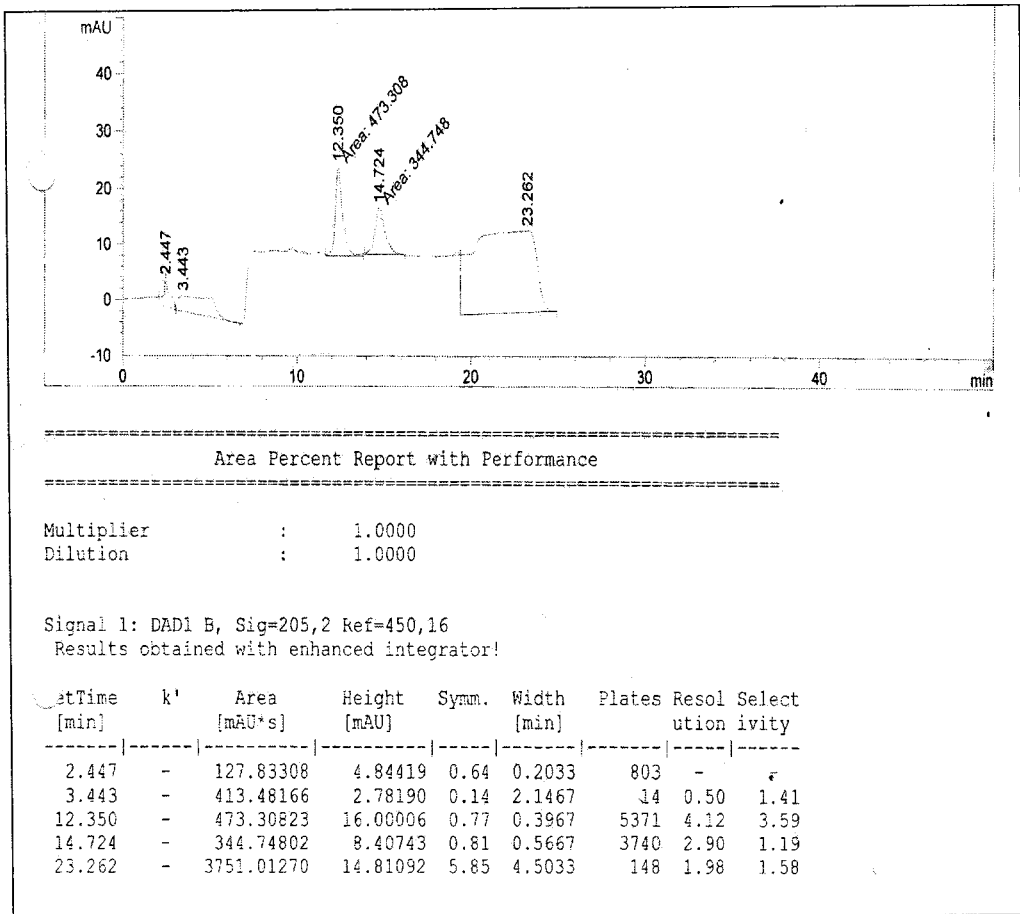
t (menit)	Metanol (%)	Dapar fosfat pH 3 (%)	Flow (ml/menit)
0-5	14.5	85.5	1
5-5.30	22.7	77.3	2
5.30-20	22.7	77.3	2
20-20.30	14.5	85.5	1
20.30-25	14.5	85.5	1

Pada analisis metabolit benzena, pada tahap preparasi sampel melibatkan proses ekstraksi sehingga digunakan internal standar dalam penentuan kadar. Internal standar yang digunakan adalah Asam benzoat.

Pada Gambar 5.1. tampak bahwa dengan sistem gradien di atas blanko pelarut yaitu air tidak memberikan respon yang dapat mengganggu analisis analit, karena tidak terdeteksi adanya puncak pada kromatogram air. Sistem eluen gradien tersebut juga mampu memisahkan analit yaitu SPMA dengan internal standar asam benzoat. Hal itu tampak dari waktu retensi (R_t) kedua senyawa yang terpisah sempurna, seperti tampak pada gambar 5.2.



Gambar 5.1. Kromatogram Blanko Pelarut Air



Gambar 5.2. Kromatogram standar SPMA 5 ppm

5.2. Validasi metode

5.2.1. Selektivitas :

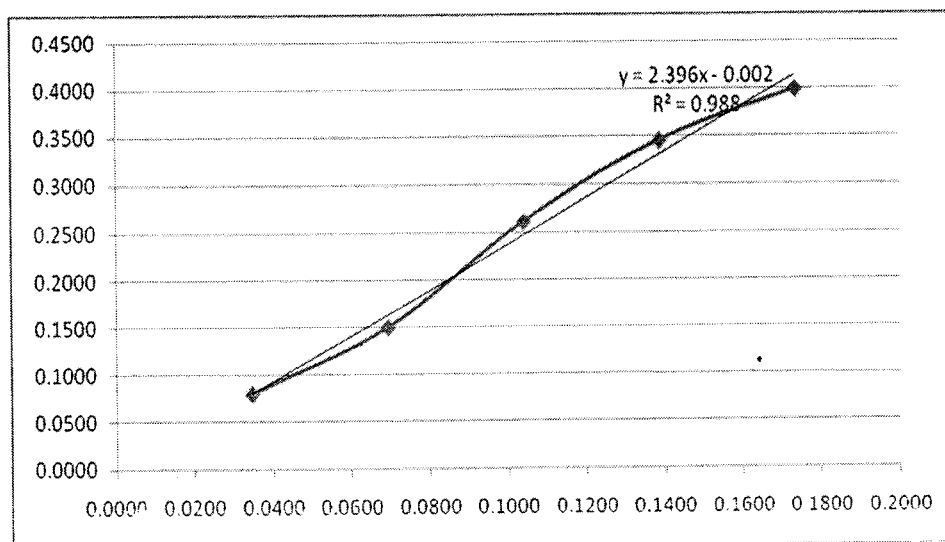
Menggunakan sistem eluen yang telah diperoleh pada tahap optimasi kondisi kromatografi, dengan eluen yang terdiri metanol dan dapar fosfat, diperoleh harga Rs atau resolusi sebagai parameter selektivitas. Berdasarkan pengamatan pada standart SPMA diperoleh nilai Rs sebesar 1,86-1,93; dimana nilai tersebut memenuhi kriteria penerimaan minimal $R_s = 1,5$.

5.2.2. Uji linieritas

Uji linieritas dilakukan pada larutan baku kerja *s-phenylmercapturic acid* dengan konsentrasi 1; 2; 3; 4; dan 5 ppm menggunakan asam benzoat 30 ppm sebagai internal standar.

Tabel 5.2. Hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi SPMA dengan Internal Standar Asam Benzoat

No	Kadar IS (ppm)	Kadar SPMA (ppm)	Area IS (mAU)	Area SPMA (mAU)	Kadar IS/Kadar SPMA	Area SPMA/Area IS
1	30,54	1,06	394,491	31,419	0,0347	0,0796
2	30,54	2,12	408,205	61,219	0,0694	0,1500
3	30,54	3,18	381,271	99,381	0,1041	0,2607
4	30,54	4,24	397,464	136,970	0,1388	0,3446
5	30,54	5,30	417,487	166,277	0,1735	0,3983



Gambar 5.3. Kurva Kalibrasi SPMA

Hasil uji linieritas menghasilkan persamaan regresi dari kurva kalibrasi $y = 2,396 x - 0,002$ dengan koefisien regresi $r = 0,9940$.

5.2.3. LOD dan LOQ

LOD dan LOQ dalam penelitian ini ditentukan dengan menggunakan persamaan garis regresi linier pada kurva kalibrasi.

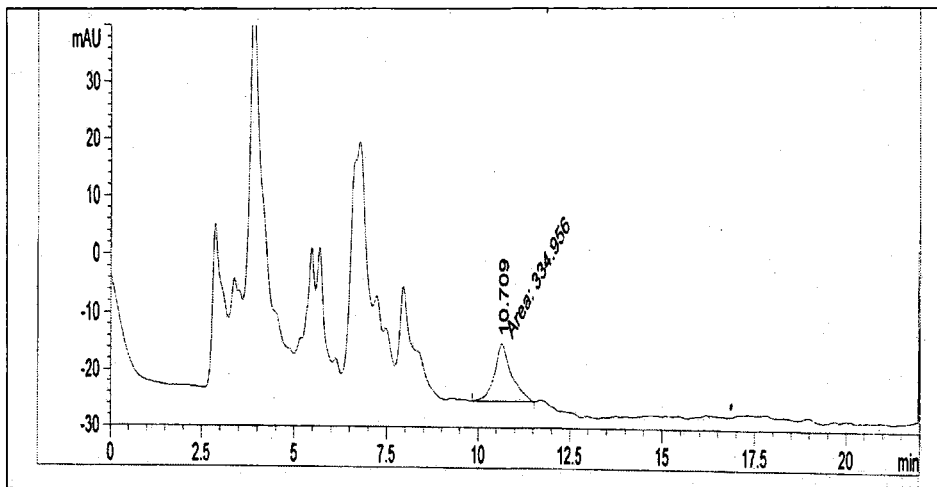
Tabel 5.3. Hasil Perhitungan Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

No	Kadar IS/Kadar SPMA (x)	Area SPMA/ Area IS (y)	yi	$\Sigma (y-y_i)^2$
1	0,0347	0,0796	0,8296	0,0020
2	0,0694	0,1500	1,6612	0,0065
3	0,1041	0,2607	2,4929	0,0245
4	0,1388	0,3446	3,3245	0,0423
5	0,1735	0,3983	4,1561	0,0505
$\Sigma =$				0,1259
$S(y/x)^2$				0,0420
$S(y/x)$				0,2048
LOD				0,7832
LOQ				2,6108

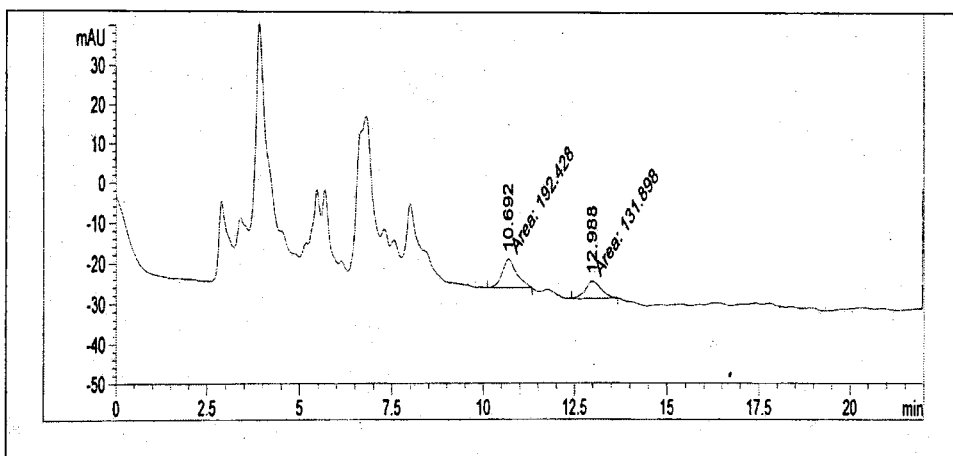
Berdasarkan hasil perhitungan seperti tampak pada Tabel 5.3., diperoleh batas deteksi analisis SPMA dengan metode HPLC adalah 0,7832 ppm sedangkan batas kuantitasi adalah 2,6108 ppm.

5.2.4. Akurasi dan Presisi

Akurasi diperoleh dari perhitungan persentase perolehan kembali (%recovery) yang dilakukan dengan metode adisi standar. Pada sampel urin yang diuji ditambahkan standar SPMA dengan konsentrasi tertentu, kemudian dianalisis dengan prosedur yang telah ditentukan dan dihitung persentase perolehan kembali kadar SPMA yang ditambahkan.



Gambar 5.4. Kromatogram Sampel Urin tanpa Adisi Standar



Gambar 5.5. Kromatogram Sampel Urin yang telah Diadisi dengan Standar SPMA 5 ppm

Tabel 5.4. Hasil Analisis Perolehan Kembali SPMA Dari Sampel Urin

Replikasi	Area standar SPMA	Area sampel	Kadar standar SPMA yang ditambahkan	Kadar SPMA yang diperoleh	% Rekoveri
1	106.3410	93.9365	5.20	4.5935	88.34
2	106.3410	99.0423	5.20	4.8431	93.14
3	106.3410	114.8960	5.20	5.6184	108.05
4	106.3410	124.5890	5.20	6.0924	117.16
5	106.3410	115.2790	5.20	5.6371	108.41
6	106.3410	108.3050	5.20	5.2961	101.85
				rerata	102.82
				SD	10.66
				KV (%)	10.37

Dari hasil analisis sampel urin yang telah ditambahkan standar SPMA 5,20 ppm, seperti tampak pada Tabel 5.4., diperoleh data % rekoveri antara 88,34 – 117,16% dengan rata-rata rekoveri 102,82%. Sedangkan presisi diperoleh dari nilai KV yaitu sebesar 10,37 %. Persyaratan validasi metode untuk sampel biologis adalah % rekoveri $\leq 80\%$ dan KV $< 20\%$.

Berdasarkan hasil validasi metode analisis di atas, dapat dilihat bahwa kriteria penerimaan parameter validasi metode dapat terpenuhi. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa metode HPLC telah memenuhi persyaratan validasi metode analisis untuk penentuan SPMA dalam urin.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Kondisi optimum kromatografi untuk analisis SPMA dalam urin adalah suhu kolom 25°C dengan eluen metanol : dapar fosfat pH 3 dengan sistem gradien.
2. Metode HPLC untuk analisis SPMA dalam urin memenuhi parameter validasi metode analisis.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, maka metode analisis HPLC dapat digunakan sebagai metode analisis penentuan SPMA dalam urin di laboratorium pengujian.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahrami, AR; JW Edwards, 2006, Evaluation of Benzene Exposure in Adults and Urinary s-Phenylmercapturic Acid in Children Living in Adelaide South Australia, **Int J Environ Sci Tech**, Vol.3 No 2 pp 113-117
- Guenel, P; Imbernon E, Chevalier A, Crinquand CA, Goldberg M, 2002, Leukemia in Relation to Occupational Exposures To Benzene and Other Agents : a Case Control Study Nested in a Cohort of Gas and Electric Utility Workers, **Am J Ind Med**, Vol 42 No. 2 pp 87-89
- Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, **Majalah Ilmu Kefarmasian**, Vo. 1 No. 3 hal. 117-135
- Irons RD, Stillman WS, 1996, The effects of Benzene and Other Leukaemogenic Agents on Haematopoietic Stem and Progenitor Cell Differentiation, **Eur J Haematol** : 60 (suppl) pp 119-124
- Lin, Lung-Cheng; Wan-Jou Chen, Yin-Mei Chiung, Tung-Sheng Shih, Pao-Chi Liao, 2008/ Association Between GST Genetic Polymorphism and Dose-Related Production of Urinary Benzene Metabolite Markers trans,trans-Muconic Acid and S-Phenylmercapturic Acid, **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Vol 17 No.6 pp 1460-1469
- Melikian, Assich A; Ray O'connor, Agassanur KP, Peifeng Hu, Heyi Li, Mark Kagan, Seth Thompson, 1999. Determination of The Urinary Benzene Metabolites S-Phenylmercapturic Acid and trans,trans-Muconic Acid by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, **Carcinogenesis** Vol.20 No.4, pp 719-726.
- Mulja Muhammad, Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**, Airlangga University Press, Surabaya
- Rohman Abdul, 2007. **Kimia Farmasi Analisis**, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, halaman 419-449
- Snyder R, Heidi OC, 1996, An Overview of Benzene Metabolism, **Environ Health Perspect** 104 pp 1165-1171
- Tharnpoophasiam, Prapin; Pornpimol Kongtip, Waranya Wongwit, Wijitr Fungladda, Dwip Kitayaporn, 2004. Simultaneous Determination of trans, trans- Muconic Acid and S-Phenylmercapturic Acid by HPLC and Its Application, **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, Vol 35 No. 3, pp 717-723.

Wiwanitkit, Viroj; Jamsai Suwansaksri, Paweena Nasuan, 2001, Urine Trans,trans-muconic Acid as a Biomarker for Benzene Exposure in Gas Station Attendance in Bangkok Thailand, **Annals of Clinical Laboratory Science** Vol.31 No. 4 pp 399-401