

**OPTIMASI PELARUT ORGANIK, KECEPATAN  
PENGADUKAN, DAN pH PADA PENENTUAN ETINIL  
ESTRADIOL DENGAN METODE EKSTRAKSI MIKRO  
TETESAN TUNGGAL SECARA HPLC**

**SKRIPSI**

**RATIH ABDIANI**

MPK 28/06

Abd  
0



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2006**



**OPTIMASI PELARUT ORGANIK, KECEPATAN  
PENGADUKAN, DAN pH PADA PENENTUAN ETINIL  
ESTRADIOL DENGAN METODE EKSTRAKSI MIKRO  
TETESAN TUNGGAL SECARA HPLC**

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh  
Gelar Sarjana sains Bidang Kimia pada  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Airlangga**



Oleh :

**RATIH ABDIANI  
NIM. 080212523**

**Tanggal Lulus : 10 Juli 2006**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**

**Pembimbing II,**

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Dra. Usreg Sri Handajani', written over a horizontal line.

**Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, Dipl. EST, M.Sc  
NIP. 132 056 928**

**Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si  
NIP. 131 286 711**

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

**Judul** : OPTIMASI PELARUT ORGANIK, KECEPATAN  
PENGADUKAN, DAN pH PADA PENENTUAN ETINIL  
ESTRADIOL DENGAN METODE EKSTRAKSI MIKRO  
TETESAN TUNGGAL SECARA HPLC

**Penyusun** : Ratih Abdiani

**NIM** : 080212523

**Pembimbing I** : Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, Dipl. EST, M.Sc

**Pembimbing II** : Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si

**Tanggal Ujian** : 10 Juli 2006

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**

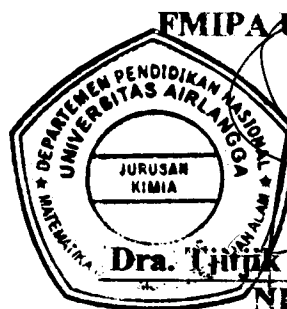
**Pembimbing II,**

Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, Dipl. EST, M.Sc  
NIP. 132 056 928

Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si  
NIP. 131 286 711

**Mengetahui :**

**Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA Universitas Airlangga**

  
Dra. Tjitra Sri Tjahjandarie, Ph.D  
NIP. 131 801 627

## PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seizin penyusun dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah.

**Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.**



Ratih Abdiani, 2006, Optimasi Pelarut Organik, Kecepatan Pengadukan, Dan pH Pada Penentuan Etinil Estradiol Dengan Metode Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal Secara HPLC. Skripsi di bawah bimbingan Dr.rer.nat.Ganden Supriyanto, M.Sc dan Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga.

---

## ABSTRAK

Telah dikembangkan teknik preparasi sampel Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT) untuk penentuan etinil estradiol dalam sampel limbah domestik dengan HPLC. Parameter-parameter analitik diantaranya pelarut organik, kecepatan pengadukan, dan pH larutan telah dioptimasi dengan hasil optimum pada pelarut organik toluen, kecepatan pengadukan 1500 rpm, dan pH larutan 5. Ekstraksi dilakukan dengan cara mengeluarkan pelarut organik dari ujung jarum mikrosyring HPLC yang dicelupkan ke dalam 25 mL larutan sampel dan diaduk dengan kecepatan pengadukan 1500 rpm kemudian dianalisis menggunakan HPLC (detektor UV-Vis pada  $\lambda$  230 nm). Dari hasil optimasi dihasilkan kurva kalibrasi untuk larutan standar etinil estradiol dengan konsentrasi 1 sampai 5 ppm dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,9984, Limit deteksi (LOD) 0,31 ppm, akurasi (*recovery*) 99,49%, standar deviasi relatif (RSD atau KV) 12,19% dan faktor pemekatan ( $EF_{tr}$ ) 198,98.

Kata kunci : Etinil estradiol, Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal, HPLC.

Ratih Abdiani, 2006, Optimization Of Organic Solvent, Agitation, And pH To The Ethinylestradiol Determination With Single Drop Microextraction Using HPLC. Script were counseled by Dr.rer.nat.Ganden Supriyanto, M.Sc and Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si Chemistry Department of Mathematic and Natural Science of Airlangga University.

---

### ABSTRACT

Single Drop Micro Extraction of sample preparation technique has been developed to determine ethinyl estradiol in liquid domestic waste using HPLC. Analitical parameters such as organic solvent, agitation, and pH solution has been optimized. Optimum condition for extraction are toluene as an organic solvent, rate agitation 1500 rpm, and pH solution 5. Extraction was achieved by suspending 3  $\mu$ L toluene drop from the tip needle of HPLC microsyringe immersed in a 25 mL sample solution and stirred at 1500 rpm then analyzed using HPLC (UV-Vis detector at  $\lambda$  230 nm). The optimized method yields a linier calibration curve in the concentration range from 1 to 5 ppm ethinyl estradiol standard solution with correlation coefficient (r) 0,9984, Limit of detection (LOD) 0,31 ppm, accuracy (recovery) 99,49%, relative standart deviation (RSD) 12,19% and the enrichment factor ( $EF_{tr}$ )198,8.

Key words : Ethinyl estradiol, Single Drop Micro Extraction, HPLC.

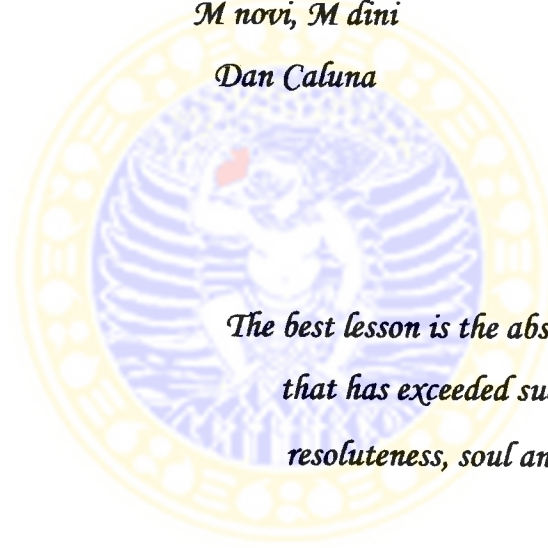
*Lack the knowledge like pitch-dark night for  
our spirit, also as the night without moon  
and star*

*Skripsi ini ku persembahkan untuk keluargaku tercinta*

*Mama, papa*

*M novi, M dini*

*Dan Caluna*



*The best lesson is the abstraction in living  
that has exceeded successful with  
resoluteness, soul and accurately*

*Work time by the lazy man was  
tomorrow, today is for his holiday*

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat serta hidayahNya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik tepat pada waktunya. Skripsi yang berjudul “Optimasi Pelarut Organik, Kecepatan Pengadukan, dan pH Pada Penentuan Etil Estradiol Dengan Metode Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal Secara HPLC” ini membahas tentang penerapan metode preparasi sampel yaitu ekstraksi mikro tetesan tunggal pada penentuan etil estradiol dalam sampel limbah domestik. Dimana etil estradiol banyak digunakan dalam pil KB, dan apabila etil estradiol ini terdapat di perairan limbah domestik dimana tidak terdapat pengolahan limbah pada limbah domestik maka akan menyebabkan fenimisme, hermaproditas serta fertilitas pada organisme air. Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memenuhi di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga.

Dengan terselesaikannya skripsi ini penyusun mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, M.Sc dan Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si selaku dosen pembimbing yang telah memberikan banyak arahan dan masukan kepada penyusun.
2. Ibu Dra. Tjitjik Srie Tjahjandarie, Ph.D, ketua jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga dan Bapak Purkan M.Si selaku dosen wali.
3. Mama, papa, kakak-kakaku yang selalu memberikan dukungan lahir batin serta do'a, adikku Caluna yang selalu memberikan tawa.



4. Teman-teman angkatan 2002 yang selalu memberikan semangat, khususnya untuk GDN grup (Masita, Alfa, Haning, Nila, Yanuar) yang selalu setia hingga akhir acara.
5. Semua pihak yang telah memberikan dukungan moral kepada penyusun dalam penyusunan skripsi.

Penyusun memahami dan menyadari bahwa skripsi ini banyak kekurangan, oleh karenanya penyusun memerlukan saran dan kritik kepada para pembaca demi kesempurnaan skripsi ini.

Semoga skripsi ini dapat bermanfaat sebagai tambahan informasi serta pengetahuan yang berguna bagi kemajuan IPTEK. Semoga Allah SWT meridloi, sehingga skripsi ini bermanfaat bagi semua.

Surabaya, Juli 2006  
Penyusun

Ratih Abdiani

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Preparasi Sampel .....	9
2.2 Ekstraksi .....	7
2.3 Ekstraksi Cair-Cair .....	10
2.4 Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT).....	13
2.5 Etilin Estradiol.....	13
2.5.1 Kegunaan etinil estradiol.....	14
2.5.2 Sumber etinil estradiol di lingkungan .....	14
2.5.3 Distribusi etinil estradiol .....	15
2.5.4 Toksisitas etinil estradiol.....	15
2.5.6 Metode penentuan etinil estradiol .....	16
2.6 Larutan Penyangga .....	16
2.7 Kromatografi .....	17
2.7.1 Besaran dalam kromatografi .....	19
2.7.1.1 Persamaan migrasi.....	19
2.7.1.2 Faktor resolusi dan faktor selektivitas.....	20
2.7.1.3 Efisiensi kolom.....	21
2.7.1.4 High equivalent of a teoritical plate (H).....	21
2.8 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	21
2.8.1 Gerbang suntik .....	22
2.8.2 Kolom <i>High Performance Liquid Chromatography</i> .....	23
2.8.3 Oven kolom .....	24
2.8.4 Pompa cairan .....	24
2.8.5 Detektor .....	24
2.8.6. Profil kromatogram HPLC .....	25
2.9 Interaksi Pelarut-Zat Terlarut .....	25

<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	27
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	27
3.2 Sampel, Bahan dan Alat.....	27
3.2.1 Sampel.....	27
3.2.2. Bahan.....	27
3.2.3. Alat.....	27
3.3 Pembuatan Larutan Standar Etinil Estradiol.....	28
3.4 Pembuatan Larutan Buffer.....	28
3.4.1 Pembuatan larutan asam asetat 2 M.....	28
3.4.2 Pembuatan larutan natrium asetat 2 M.....	28
3.4.3 Pembuatan larutan natrium dihidrogenfosfat 2 M.....	28
3.4.4 Pembuatan larutan natrium hidroksida 2 M.....	29
3.4.5 Pembuatan bufer asetat.....	29
3.4.6 Pembuatan bufer fosfat.....	29
3.5 Pembuatan Larutan NaCl 500 ppm.....	29
3.6 Pembuatan NaLS 500 ppm.....	30
3.7 Pembuatan Eluen.....	30
3.8 Pembuatan Kurva Baku Standar.....	30
3.9 Optimasi Parameter-Parameter Analitik.....	31
3.9.1 Pengaruh jenis pelarut organik.....	31
3.9.2 Pengaruh pH.....	31
3.9.3 Pengaruh kecepatan pengadukan.....	32
3.10 Pembuatan Kurva Baku.....	32
3.11 Penentuan Parameter-Parameter Validasi.....	33
3.11.1 Uii koefisien variasi.....	33
3.11.2 Penentuan limit deteksi.....	33
3.11.3 Penentuan persen recovery.....	34
3.11.4 Perhitungan enrichment factor.....	34
3.12 Analisis Sampel Limbah Domestik.....	35
3.12.1 Spiking.....	36
3.13 Skema Kerja.....	37
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Pembuatan Kurva Baku Tanpa EMTT.....	38
4.2 Optimasi Parameter-Parameter Analitik.....	40
4.2.1 Optimasi pelarut organik.....	40
4.2.2 Optimasi kecepatan pengadukan.....	42
4.2.3 Optimasi pH larutan.....	44
4.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi.....	46
4.4 Penentuan Parameter-Parameter Validasi.....	47
4.4.1 Ketepatan (akurasi).....	47
4.4.2 Ketelitian.....	48
4.4.3 Limit deteksi.....	48
4.5 Analisis Sampel.....	49
4.5.1 Enrichment factor.....	52

<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	53
5.2 Saran .....	53
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>54</b>
<b>LAMPIRAN</b>	



## DAFTAR TABEL

<b>Nomor</b>	<b>Judul Tabel</b>	<b>Halaman</b>
4.1	Data hubungan antara luas area dengan konsentrasi etinil estradiol ...	39
4.2	Pengaruh pelarut organik terhadap luas area rata-rata .....	41
4.3	Karakteristik pelarut organik.....	42
4.4	Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap luas area rata-rata .....	42
4.5	Pengaruh pH larutan terhadap luas area rata-rata.....	44
4.6	Data kurva kalibrasi hasil optimasi .....	46
4.7	Data persen <i>recovery</i> larutan standar .....	47
4.8	Data koefisien variasi larutan standar .....	48
4.9	Data analisis sampel .....	49
4.10	Data metode spiking untuk sampel Kecamatan Sawahan .....	50
4.11	Data metode spiking untuk sampel Kecamatan Wonokromo .....	50
4.12	Data metode spiking untuk sampel Kecamatan Karang Pilang .....	51

**DAFTAR GAMBAR**

<b>No.</b>	<b>Judul</b>	<b>Halaman</b>
1.	Skema proses analisis.....	8
2.	Skema eskstraksi EMTT .....	12
3.	Struktur etinil estradiol.....	14
4.	Rangkaian instrumen HPLC.....	22
5.	Hubungan antara luas area dan konsentrasi etinil estradiol .....	39
6.	Grafik hubungan pelarut organik dengan luas area rata-rata .....	41
7.	Grafik hubungan kecepatan pengadukan dengan luas area rata-rata ..	43
8.	Grafik hubungan pH larutan dengan luas area rata-rata.....	45
9.	Kurva kalibrasi hasil optimasi.....	46
10.	Grafik hubungan konsentrasi dengan luas area rata-rata..... (sampel Kec Sawahan)	50
11.	Grafik hubungan konsentrasi dengan luas area rata-rata .....	51
	(sampel Kec Wonokromo)	
12.	Grafik hubungan konsentrasi dengan luas area rata-rata .....	51
	(sampel Kec Karang Pilang)	

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Nomor</b>	<b>Judul Lampiran</b>
1	Pembuatan larutan
2	Data kurva standar etinil estradiol tanpa ETM
3	Data optimasi parameter-parameter analitik
4	Data kurva kalibrasi hasil optimasi
5	Data Sampel
6	Kromatogram

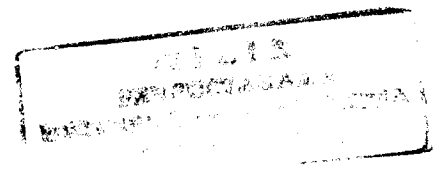


# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang Permasalahan**

Dalam proses analisis suatu senyawa kimia terdapat beberapa tahapan yaitu sampling, preservasi sampel, preparasi sampel, dan analisis. Dari tahapan-tahapan tersebut yang paling memegang peranan penting yaitu tahapan preparasi sampel, hal ini dikarenakan tidak semua analit atau sampel dapat di analisis secara langsung menggunakan instrumen yang telah banyak digunakan, walaupun instrumen-instrumen analisis tersebut telah dilengkapi dengan detektor bersensivitas tinggi. Banyaknya matriks dalam sampel akan mengganggu proses analisis suatu analit, sehingga preparasi sampel merupakan hal yang penting. Preparasi sampel juga diperlukan untuk memekatkan analit sehingga sensitivitas pengukuran dapat ditingkatkan. Tujuan preparasi sampel sendiri adalah untuk mengisolasi analit dari matrik sampel dan memekatkannya agar bisa terdeteksi oleh instrumen yang ada. Ekstraksi cair-cair (Liquid-Liquid Extraction-LLE) adalah salah satu cara yang biasa digunakan untuk preparasi sampel. Metode ini mempunyai beberapa keuntungan yaitu kapasitas sampelnya besar, ekstrak pelarut organiknya bisa langsung diinjeksikan ke instrumen dan tersedianya pustaka yang memadai. Ekstraksi cair-cair konvensional adalah menggunakan corong pisah dalam ekstraksinya, sehingga memerlukan jumlah pelarut organik yang cukup tinggi. Untuk mengatasinya telah dikembangkan beberapa metode diantaranya adalah Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT).





Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT) adalah teknik ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik dalam jumlah sangat sedikit (dalam kisaran mikroliter) yang dibiarkan menggantung di ujung jarum syring dan diletakkan di dalam larutan sampel. Larutan sampel selalu diaduk dengan bantuan pengaduk magnetik supaya transfer massa senyawa target ke pelarut organik berlangsung sempurna.

Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal diharapkan dapat diaplikasikan untuk menganalisis senyawa etinil estradiol di dalam limbah cair domestik, dimana etinil estradiol banyak digunakan dalam pil-KB. Dari data Perkumpulan Keluarga Berencana Indonesia, pengguna pil KB berada pada posisi pertama dengan prosentase 38,74%. Sedangkan data nasional hingga Februari 2003, pengguna pil KB berada pada posisi kedua dengan jumlah 34,57% ([http://www.bkkbn.go.id/article\\_detail.php?aid=383](http://www.bkkbn.go.id/article_detail.php?aid=383), 20 Desember 2005). Kontrasepsi oral atau pil terdiri atas pil kombinasi dan minipil. Pil kombinasi mengandung hormon estrogen semi sintetis dan hormon progesteron. Kandungan hormon estrogen semi sintetis biasanya untuk menghambat ovulasi, menekan perkembangan telur yang dibuahi dan ada kemungkinan dapat menghambat implantasi. Sedangkan progesteron akan menghambat ovulasi. Hormon estrogen yang biasa digunakan adalah etinil estradiol. Etinil estradiol termasuk dalam golongan senyawa pengganggu fungsi endokrin atau yang biasa disebut *Endocrine Disrupting Compounds* (EDCs). Bahaya dari estrogen semi sintetis ini diantaranya adalah feminisme, hermaproditas dan fertilitas pada organisme air walaupun pada konsentrasi yang sangat rendah (pg-ng/L). Senyawa etinil estradiol ini dikeluarkan

dari dalam tubuh setelah proses metabolisme melalui urin dan sebagian kecil melalui feses.

Kompleksnya matrik dalam sampel dan rendahnya konsentrasi dari senyawa tersebut di lingkungan, menyebabkan perlu dikembangkan suatu metode analisis yang mempunyai sensitivitas dan selektivitas tinggi untuk menentukan seberapa besar kandungan etinil estradiol dalam limbah domestik cair. Metode analisis dengan tahapan preparasi sampel yang telah dikembangkan untuk penentuan etinil estradiol, diantaranya *Solid-Phase Extraction* (SPE) yang dilakukan oleh Lopez de Alda et al. pada tahun 2001. Braun et al. menggunakan teknik *solid-phase microextraction* (SPME) untuk penentuan aktivitas  $17\alpha$ -ethinylestradiol di permukaan perairan dan sedimen pada tahun 2002. Pada tahun 2003, Silvia Diaz-Crus et al. menggunakan teknik spektrometri untuk analisis etinil estradiol. Sedangkan pada tahun 2004, Cespedes et. al. menggunakan teknik *recombinant yeast assay* dan analisis kimia dengan LC-ESI-MS. Pada tahun yang sama Rodriguez-Mazaz et al., menggunakan teknik SPE-LC-MS untuk memonitor estrogen di air hasil pengolahan air minum dan pada air alami. Metode-metode yang telah disebutkan di atas mempunyai sensitivitas yang relatif tinggi, akan tetapi metode-metode tersebut masih mempunyai banyak kelemahan diantaranya adalah waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi relatif lama. Metode *Solid Phase Microextraction* (SPME) tidak menggunakan pelarut organik dalam ekstraksinya, akan tetapi metode ini belum bisa digunakan untuk analisis senyawa etinil estradiol secara rutin. Hal ini disebabkan karena biaya analisisnya relatif mahal.

Dari uraian diatas maka perlu dikembangkan metode alternatif untuk menentukan kadar etinil estradiol.

Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT) atau yang biasa disebut SDME (*Single Drop Micro Extraction*) adalah teknik preparasi yang paling tepat untuk analisis senyawa etinil estradiol karena pelarut organik yang dibutuhkan dalam ekstraksi sangat sedikit (dalam ukuran mikroliter) sehingga limbah pelarut organik yang dihasilkan juga sedikit, kesetimbangan distribusinya cepat tercapai, pemisahan fasanya sempurna, dan ekstraknya langsung dapat diinjeksikan ke *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) atau GC (*Gas Chromatography*)

Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT) telah diaplikasikan untuk penentuan yodium pada obat-obatan, yodium yang digunakan pada garam, susu bubuk dan sayur-sayuran dengan mengubah yodium ke bentuk 4-iodo-N,N-dimethylaniline yang dilakukan Das (2003) dengan persen *recovery* antara 99 % sampai 107%. EMTT juga telah digunakan untuk penentuan dialkyl phthalate esters di makanan (Batlle dan Nerin, 2004). EMTT dapat juga digunakan untuk preparasi senyawa volatil secara *headspace* dengan detektor kromatografi gas, seperti pada preparasi sampel dalam analisis klorobenzena (He dan Lee, 1997), nitroaromatis yang bersifat eksplosif (Psillakis, 2001), Penentuan amina alifatis pada perairan (Kaykhali et al., 2004). Analisis *organo phosphorous insecticides* di air juga dapat menggunakan EMTT (Lambropouloa et al., 2004), Colombini et al. (2004) menggunakan metode *headspace* EMTT untuk penentuan kadar senyawa *organotin* dalam sampel air dan sedimen, dan juga untuk penentuan metil merkuri

dengan AAS elektrotermal (Gil et al., 2004). Hasil penelitian di atas diperoleh persen *recovery* yang cukup tinggi, akan tetapi metode ini juga mempunyai kelemahan diantaranya adalah tetesan pelarut organik mudah jatuh apabila kecepatan pengadukan terlalu tinggi. Pengadukan selama proses ekstraksi dimaksudkan agar transfer massa senyawa target ke pelarut organik berlangsung sempurna. Sehingga dalam penelitian ini kecepatan pengadukan akan dioptimasi. Harga pH larutan juga akan di optimasi disamping pelarut organik yang digunakan untuk ekstraksi. Adanya garam terlarut dalam lingkungan perairan juga akan mempengaruhi hasil ekstraksi. Kadar garam di lingkungan perairan adalah sekitar 5 ppm ([www.waternetonline.ihe.nl/aboutWN/pdf/palamuleni&al.pdf](http://www.waternetonline.ihe.nl/aboutWN/pdf/palamuleni&al.pdf), 11 Januari 2006), sehingga dalam proses ekstraksi juga akan ditambahkan garam (NaCl) sebesar 5 ppm. Selain garam, komponen lain yang ditambahkan adalah NaLS (Natrium Lauril Sulfat). NaLS banyak digunakan sebagai deterjen. Deterjen merupakan surfaktan yaitu senyawa yang karena orientasi dan pengaturan molekul pada permukaan larutan, dapat menurunkan tegangan permukaan. Surfaktan mempunyai dua bagian yang berbeda, yaitu bagian yang bersifat hidrofil atau polar dan bagian lipofil atau non polar. Di dalam campuran pelarut polar dan non polar apabila terdapat surfaktan maka pada batas cairan tersebut, bagian non polar dari surfaktan akan berorientasi ke pelarut non polar sedangkan gugus polar akan berorientasi ke pelarut polar. Hal tersebut akan menyebabkan tetesan pelarut organik tidak stabil. Dalam limbah domestik cair dimungkinkan adanya deterjen sebesar 0,3744 ppm pada pagi hari dan 0,5990 ppm pada sore hari (Nugroho, 2001), sehingga pada proses ekstraksi juga akan ditambahkan salah satu

komponen deterjen yaitu NaLS sebesar 0,5 ppm. Hasil dari optimasi tersebut digunakan untuk analisis etinil estradiol dalam limbah domestik cair.

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang masalah tersebut di atas maka dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. bagaimana kondisi optimum pelarut organik, kecepatan pengadukan dan pH larutan sampel pada ekstraksi etinil estradiol dengan menggunakan EMTT secara HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)?
2. apakah metode EMTT yang sudah dioptimasi dapat digunakan untuk analisis etinil estradiol dalam sampel limbah domestik cair?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. mengetahui kondisi optimum pelarut organik, kecepatan pengadukan dan pH larutan sampel pada ekstraksi etinil estradiol dengan menggunakan EMTT secara HPLC,
2. mengaplikasikan EMTT untuk menentukan kadar etinil estradiol dalam limbah domestik.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang salah satu teknik preparasi sampel yaitu ekstraksi mikro tetesan tunggal untuk penentuan kadar etinil estradiol dalam sampel limbah domestik.

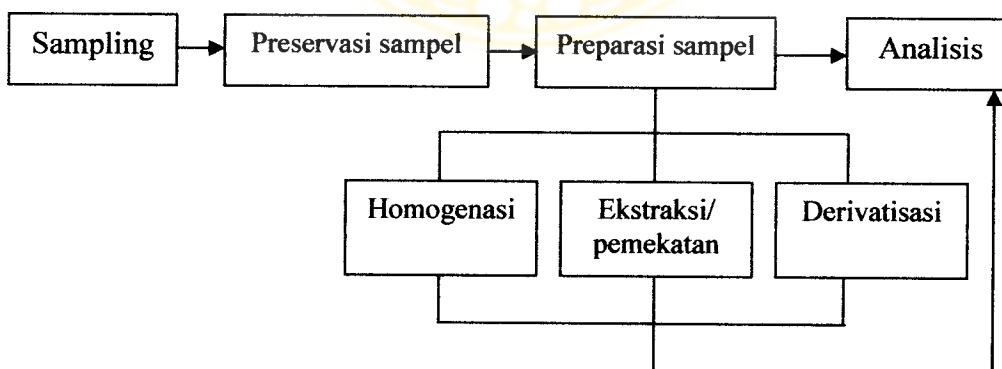


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan salah satu tahap terpenting dalam analisis suatu sampel. Hal ini dikarenakan tidak semua analit atau sampel dapat di analisis secara langsung menggunakan instrumen yang telah banyak digunakan, walaupun instrumen-instrumen analisis tersebut telah dilengkapi dengan detektor bersensivitas tinggi dan telah dikembangkan juga diterapkan secara luas untuk menganalisis senyawa target dalam matriks tertentu dengan limit deteksi yang sangat rendah. Banyaknya matriks dalam sampel akan mengganggu proses analisis suatu analit, sehingga preparasi sampel merupakan hal yang penting. Preparasi sampel juga diperlukan untuk memekatkan analit sehingga sensitivitas pengukuran dapat ditingkatkan. Kedudukan preparasi sampel dalam proses analisis ditunjukkan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Skema Proses Analisis

Tahap preparasi sampel umumnya mencakup proses ekstraksi yang tujuannya adalah mengisolasi senyawa target dari matriksnya dan memekatkannya.

## 2.2 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi sangat bervariasi berdasarkan tingkat selektivitas dan kecepatannya yang tidak hanya tergantung kepada pendekatan-pendekatan dan kondisi-kondisi yang digunakan tetapi juga tergantung pada konfigurasi fasa-fasa yang digunakan dalam proses tersebut. Prinsip ekstraksi didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling campur (Khopkar, 1990). Apabila perbedaan kelarutan zat tersebut semakin besar, maka semakin sempurna pemisahan tersebut. Teknik ini dapat digunakan untuk tujuan preparatif, pemurnian, pemisahan serta analisis pada semua skala kerja.

Berdasarkan bentuk campuran sampel yang akan diekstraksi, ekstraksi dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Aktivitas suatu spesi kimia dalam satu fasa merupakan suatu rasio yang konstan terhadap aktivitas spesies itu dalam fasa cair yang lain (Day, 1998) sehingga dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$\frac{a_{A_1}}{a_{A_2}} = K_{D_A} \dots\dots\dots (2)$$

Dengan  $a_{A_1}$  menyatakan aktivitas zat terlarut A dalam fasa 1, sedangkan  $a_{A_2}$  menyatakan aktivitas zat terlarut A dalam fasa 2. Tetapan  $K_{D_A}$  disebut koefisien distribusi dari spesies A.

Bila suatu substansi ekstraksi pelarut mengambil bagian dalam kesetimbangan-kesetimbangan lain dalam salah satu (atau kedua) fasa itu, suatu



angka banding  $D$  dapat bermanfaat dimana konsentrasi dijumlahkan untuk semua spesies yang relevan dalam kedua fasa itu (Day, 1998).

$$D = \frac{[total\ solut]_{org}}{[total\ solut]_{air}} \dots\dots\dots (3)$$

Bagian solut yang terekstraksi tidak tergantung dari banyaknya zat awal, akan tetapi tergantung dari volume kedua pelarut (Day, 1998). Efektivitas ekstraksi dinyatakan dengan persen zat yang terekstraksi sebagai %E dan dirumuskan sebagai berikut :

$$\%E = \frac{[S]_o V_o}{[S]_o V_o + [S]_a V_a} \times 100\% \dots\dots\dots (4)$$

Dengan  $[S]_o$  adalah konsentrasi solut dalam fasa organik,  $[S]_a$  adalah konsentrasi solut dalam fasa air,  $V_o$  adalah volume fasa organik dan  $V_a$  adalah volume fasa air.

### 2.3 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair–cair adalah suatu teknik preparasi sampel yang telah digunakan secara luas, baik analisis secara kuantitatif ataupun analisis secara kualitatif. Teknik ekstraksi cair-cair konvensional biasanya dilakukan dengan menggunakan labu pemisah (*separatory funnel*). Terdapat tiga metode dasar pada ekstraksi cair-cair yaitu ekstraksi bertahap (*batch*), ekstraksi kontinyu, dan ekstraksi *counter current*. Hasil ekstraksi baik jika diperoleh dengan jumlah ekstraksi yang relatif besar dengan jumlah pelarut yang kecil. Teknik ekstraksi cair-cair mempunyai keunggulan yaitu tingginya kapasitas sampel jika dibandingkan dengan teknik fasa terdistribusi pada sistem *batch* yang lain, ekstrak fasa organiknya dapat

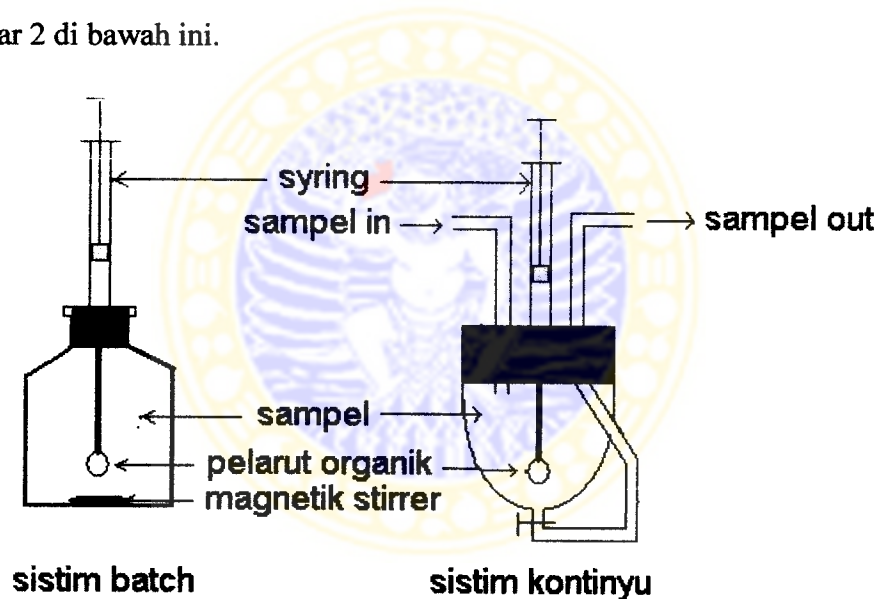
dianalisis secara langsung menggunakan instrumen-instrumen analisis seperti kromatografi cair dan kromatografi gas, dan sudah tersedia banyak pustaka sejak beberapa dekade yang memuat banyak sekali informasi tentang pemilihan pelarut organik, pH, dan jenis serta konsentrasi dari pereaksi yang harus digunakan. Disamping itu metode ini juga mempunyai beberapa kelemahan diantaranya timbulnya emulsi, tingginya konsumsi pelarut organik yang dibutuhkan, menghasilkan limbah pelarut organik dalam jumlah yang besar, proses ekstraksinya membutuhkan waktu yang lama, dan tidak dapat dilakukan secara otomatis. Untuk mengatasi masalah-masalah diatas, telah banyak dikembangkan teknik-teknik preparasi sampel diantaranya adalah *Flow Injection Extraction* (FIE), *Solid-Phase Extraction* (SPE), *Solid-Phase Microextraction* (SPME) dan *Single Drop Micro Extraction* (SDME) atau ekstraksi mikro tetesan tunggal.

#### **2.4 Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT)**

Ekstraksi mikro tetesan tunggal adalah teknik ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik dalam jumlah sangat sedikit (dalam kisaran mikroliter) yang dibiarkan menggantung di ujung jarum syring dan diletakkan di dalam larutan sampel. Larutan sampel selalu diaduk dengan bantuan pengaduk magnetik supaya transfer massa senyawa target ke pelarut organik berlangsung sempurna (Liu and Dasgupta, 1996).

Berdasarkan cara ekstraksi senyawa target, teknik ini dapat dibagi menjadi dua, yaitu sistem *batch* dan sistem kontinyu. Dalam sitem *batch* sejumlah volume pelarut organik di ujung syring dimasukkan ke dalam sejumlah volume sampel.

Larutan sampel tersebut diaduk terus-menerus dengan menggunakan pengaduk magnetik. Setelah proses ekstraksi maka pelarut organiknya ditarik kembali ke dalam syring dan diinjeksikan langsung ke instrumen analisis (HPLC atau GC). Sedangkan dalam sistem kontinyu pelarut organik di ujung syring diletakkan dalam mikro reaktor yang dialiri sampel sehingga proses ekstraksi terjadi secara kontinyu. Dengan cara yang sama pelarut organiknya ditarik kembali ke dalam syring dan di injeksikan langsung ke instrumen analisis (HPLC atau GC). Skema ekstraksi mikro tetesan tunggal secara *batch* dan kontinyu ditunjukkan oleh Gambar 2 di bawah ini.



Gambar 2. Skema ekstraksi EMTT

Pemekatan senyawa target akan terjadi karena volume pelarut organiknya jauh lebih kecil jika dibandingkan dengan volume sampel. Derajat pemekatan teoritis adalah perbandingan antara volume sampel dan volume pelarut organik. Transfer massa senyawa target dari larutan sampel ke pelarut organik dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah volume tetesan pelarut organik, kecepatan

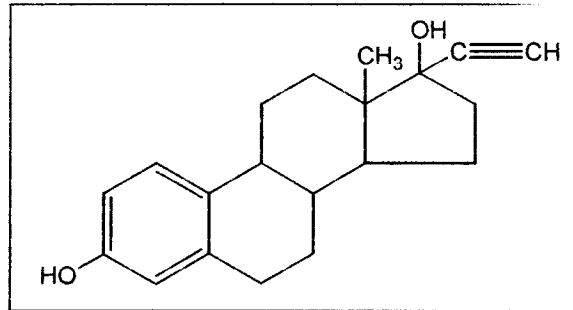
pengadukan (untuk sistem *batch*) dan kecepatan laju alir sampel (untuk system kontinyu).

Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal (EMTT) telah diaplikasikan untuk penentuan yodium pada obat-obatan, yodium yang digunakan pada garam, susu bubuk dan sayur-sayuran dengan mengubah yodium ke bentuk 4-iodo-N,N-dimethylaniline yang dilakukan Das (2003) dengan persen *recovery* antara 99 % sampai 107%. EMTT juga telah digunakan untuk penentuan dialkyl phthalate esters di makanan (Batlle and Nerin, 2004). EMTT dapat juga digunakan untuk preparasi senyawa volatil secara *headspace* dengan detektor kromatografi gas, seperti pada preparasi sampel dalam analisis klorobenzena (He and Lee, 1997), nitroaromatis yang bersifat eksplosif (Psillakis, 2001), Penentuan amina alifatis pada perairan (Kaykhai et al., 2004). Analisis *organo phosphorous insecticides* di air juga dapat menggunakan EMTT (Lambropouloa et al., 2004), Colombini et al. (2004) menggunakan metode *headspace* EMTT untuk penentuan kadar senyawa *organotin* dalam sampel air dan sedimen, dan juga untuk penentuan metil merkuri dengan AAS elektrotermal (Gil et al., 2004).

## 2.5 Etinil Estradiol

Etinil estradiol dapat digolongkan sebagai hormon estrogen semi sintetik yang bersifat pengganggu fungsi endokrin (*Endocrine Distrupting Compounds-EDCs*) yang mendapat perhatian yang sangat luas dari peneliti dan pemerhati lingkungan karena efeknya yang membahayakan kesehatan. Etinil estradiol telah digunakan secara luas dalam pil kontrasepsi bersama dengan progestin.

Etinil estradiol mempunyai struktur seperti dibawah ini



Gambar 3. Struktur etinil estradiol

Sifat fisika dan kimia dari etinil estradiol adalah (Kuster et al,2004) :

- Berat Molekul : 296,41  
 Kelarutan dalam air : 11,3 mg/l (27<sup>o</sup>C); 3,1mg/l (23<sup>o</sup>C)  
 Harga K<sub>ow</sub> : 10<sup>3</sup> sampai 10<sup>5</sup>

### 2.5.1 Kegunaan etinil estradiol.

Selain digunakan untuk pil kontrasepsi, etinil estradiol juga digunakan untuk pengaturan pada sindrom menopause dan post menopause, untuk terapi defisiensi estrogen, dan pengobatan pada beberapa pnyalit kanker seperti kanker prostat pada laki-laki dan kanker payudara pada wanita yang telah mengalami masa menopause (Kuster, 2004).

### 2.5.2 Sumber etinil estradiol di lingkungan.

Estrogen semi sintetis masuk ke lingkungan karena hasil pembuangan limbah industri maupun limbah rumah tangga. Ekskresi dari manusia merupakan sumber yang paling utama untuk senyawa etinil estradiol. Senyawa ini dikeluarkan dari tubuh setelah proses metabolisme melalui urin dan sebagian kecil feses. Senyawa etinil estradiol yang telah terkonjugasi (biasanya sebagai senyawa glukuronida

maupun sulfat) dapat menjadi senyawa induknya dengan bantuan enzim  $\beta$ -*glucuronidase* dan *arylsulfatase* (Kuster, 2004)

Etinil estradiol lebih stabil dibandingkan dengan estradiol pada musim panas, dan akan lebih stabil pada musim dingin (Kuster, 2004). Kecepatan biodegradasi pada perairan yang mengandung banyak garam akan lebih lama, karena akan menghambat mikroba untuk proses biodegradasi. Proses biodegradasi pada senyawa ini dibawah kondisi aerob, sedangkan pada kondisi anaerob degradasinya berjalan lambat.

### **2.5.3 Distribusi etinilestradiol.**

Konsentrasi etinil estradiol di lingkungan perairan berada pada tingkat lebih kecil dari ng/L sampai 10 ng/L. Rendahnya polaritas senyawa ini, dengan koefisien partisi oktanol-air  $10^3$  sampai  $10^6$ , menyebabkan senyawa ini mudah sekali teradsorpsi oleh sedimen. Menurut Jurgens (1999) sebanyak 13-92% estrogen yang masuk ke lingkungan akan teradsorpsi oleh sedimen dalam jangka waktu 24 jam pertama setelah kontak. Hal ini yang menyebabkan rendahnya konsentrasi etinil estradiol pada perairan dan bukan karena proses biodegradasi (Kuster, 2004).

### **2.5.4 Toksisitas etinil estradiol.**

Potensi estrogenik pada etinil estradiol lebih tinggi dibandingkan dengan estrogen alami (<http://www.mindfully.org/Pesticide/2002/Potency-Phyto-Synthetic2002.htm>, 18 mei 2005). Toksisitas yang diakibatkan oleh etinil estradiol selain dapat menyebabkan feminisme dan hermaphroditas pada organisme air juga dapat menyebabkan pengurangan jumlah sperma, menghambat perkembangan

organ seks, vitellogenin (protein yang biasanya terdapat pada ikan betina) terdapat pada ikan jantan, kanker payudara, ovarium, testis dan prostat, dan mengurangi fertilitas.

#### **2.5.5 Metode penentuan etinil estradiol.**

Metode analisis dengan tahapan preparasi sampel yang telah dikembangkan untuk analisis etinil estradiol, diantaranya *Solid-Phase Extraction* (SPE) yang dilakukan oleh Lopez de Alda et al. pada tahun 2001. Braun et al. menggunakan teknik *Solid-Phase Micro Extraction* (SPME) untuk penentuan aktivitas  $17\alpha$ -*ethinylestradiol* di permukaan perairan dan sedimen pada tahun 2002, dimana pada pH tinggi (pH 8) menunjukkan respon analisis yang rendah sedangkan untuk pH rendah (pH 2) respon analisisnya tinggi. Pada tahun 2003, Silvia Diaz-Crus et al. menggunakan teknik spektrometri untuk analisis etinil estradiol. Sedangkan pada tahun 2004, Cespedes et. al. menggunakan teknik *recombinant yeast assay* dan analisa kimia dengan LC-ESI-MS. Pada tahun yang sama Rodriguez-Mazaz et al. Menggunakan teknik SPE-LC-MS untuk memonitor estrogen di air hasil pengolahan air minum dan pada air alami.

#### **2.6 Larutan Penyangga**

Larutan penyangga adalah suatu larutan yang dapat menahan perubahan pH yang besar ketika ion-ion hidrogen atau hidroksida ditambahkan atau ketika larutan itu diencerkan. Keefektifan suatu larutan penyangga dalam menahan perubahan pH persatuan asam atau basa kuat yang ditambahkan, mencapai nilai

maksimumnya ketika rasio asam penyangga terhadap garam adalah satu (Day, 1998).

Kapasitas suatu penyangga merupakan ukuran keefektifannya dalam menahan perubahan pH pada penambahan asam atau basa. Semakin besar konsentrasi asam dan basa konjugatnya, semakin besar kapasitas penyangga. Kapasitas penyangga dapat didefinisikan secara lebih kuantitatif dengan jumlah mol basa kuat dibutuhkan untuk mengubah pH 1 liter larutan sebesar 1 pH satuan. Perubahan pH yang cukup besar saat pengenceran akan terjadi jika konsentrasi komponen penyangga berada di bawah sekitar  $10^{-4}$  M (Day, 1998).

## 2.7 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran zat-zat kimia yang berdasar pada perbedaan migrasi dari masing – masing komponen campuran yang terpisah pada fasa diam (fasa *stasioner*) di bawah pengaruh pergerakan fasa yang bergerak yaitu fasa mobil (Mulja,1995). Pemisahan dengan metoda kromatografi dapat terjadi karena perbedaan kelarutan dari suatu molekul atau senyawa terhadap suatu pelarut, perbedaan sifat dapat menguap pada temperatur yang berbeda satu sama lain dan juga sifat untuk bertaut (adsorpsi) yang berbeda satu sama lain dengan suatu serbuk bahan padat. Pada pemisahan secara kromatografi, senyawa–senyawa yang akan dipisahkan ditempatkan dalam sistem yang bergerak (fasa mobil) yang mengalir melalui suatu sistem yang diam (fasa diam), dan selama pengaliran fasa mobil akan terjadi proses pelarutan, adsorpsi maupun penguapan. Dalam praktek, kromatografi dilaksanakan dalam situasi yang



dinamis, salah satu dari kedua fasa merupakan fasa bergerak dan fasa lainnya merupakan fasa diam.

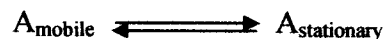
Terdapat empat asas terjadinya proses pemisahan pada kromatografi yaitu:

- a. Kromatografi dengan asas adsorpsi dengan memakai fasa diam padat dan fasa gerak cair atau gas, dimana pemisahan komponen-komponen akan sangat tergantung pada perbedaan polaritas molekul-molekul yang akan dipisahkan dan sebagai contohnya adalah *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC),
- b. Kromatografi dengan asas partisi dengan memakai fasa diam cair dan fasa gerak cair, dimana pemisahan komponen-komponen akan sangat tergantung pada perbedaan koefisien distribusi (K) molekul-molekul yang dipisahkan,
- c. Kromatografi dengan asas filtrasi dengan memakai fasa diam padat yang mempunyai sifat filtrasi terhadap komponen yang mempunyai massa molekul relatif (Mr) yang tinggi dan fasa diam padat (gel dan semacamnya). Sedangkan sebagai fasa gerak adalah cairan,
- d. Kromatografi dengan asas suhu kritik yang prinsipnya merupakan pengembangan metode kromatografi gas dan HPLC. Sebagai fasa mobil dipakai CO<sub>2</sub> dalam keadaan superkritik.

## 2.7.1 Besaran dalam kromatografi.

### 2.7.1.1 Persamaan migrasi.

Semua pemisah kromatografi pada dasarnya terjadi atas perbedaan kelarutan partisi zat terlarut antara fasa gerak dan fasa diam. Untuk zat terlarut A, dapat dituliskan hubungan kesetimbangan dalam suatu persamaan :



Suatu konstanta kesetimbangan (K) untuk reaksi diatas disebut koefisien distribusi atau koefisien partisi yang didefinisikan sebagai :

$$K = \frac{C_s}{C_m} \dots\dots\dots (6)$$

Dengan  $C_s$  dan  $C_m$  berturut – turut adalah kadar kesetimbangan zat terlarut dalam fasa diam dan fasa gerak (Skoog, 1996). Pemisahan komponen dalam suatu campuran terjadi karena perbedaan kecepatan migrasi zat terlarut dalam sistem kromatografi. Dimana jika harga K kecil maka analit akan lebih banyak di dalam fasa gerak yang berarti analit akan lebih lama tinggal di dalam fasa gerak.

Faktor kapasitas ( $K'$ ) merupakan parameter yang penting untuk menggambarkan laju migrasi solut dalam kolom, yang didefinisikan sebagai (Skoog, 1996) :

$$K' = \frac{K.V_s}{V_m} \dots\dots\dots (7)$$

Dengan  $V_s$  dan  $V_m$  adalah volume solut dalam fasa diam dan fasa gerak.

Dalam suatu tipe kromatogram terdapat istilah waktu retensi yaitu waktu yang diperlukan solut mulai saat injeksi sampai sampel keluar dari kolom dengan melintasi kolom sepanjang L, dinyatakan sebagai  $t_r$ . Sedangkan sampel atau fasa

gerak yang tidak ditahan dinyatakan dengan waktu mati  $t_m$ . Hubungan waktu retensi, waktu mati dan faktor kapasitas adalah (Skoog, 1996):

$$K' = \frac{t_r - t_m}{t_m} \dots\dots\dots (8)$$

Pada pemisahan dengan menggunakan HPLC, diupayakan agar faktor kapasitas dari analit sebesar 1 dan 10. Apabila terlalu rendah, maka analit tidak terpisah dengan baik dan untuk faktor kapasitas yang terlalu besar, maka waktu yang diperlukan untuk analisis lama (Lindsay, 1992).

### 2.7.1.2 Faktor resolusi dan faktor selektivitas.

Faktor resolusi adalah ukuran pemisahan relatif dua puncak. Resolusi ( $R_s$ ) didefinisikan sebagai jarak antara 2 pusat pita dibagi dengan rata-rata lebar puncak yang diukur pada dasar puncak :

$$R_s = \frac{2[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A + W_B} \dots\dots\dots (9)$$

Harga  $R$  sangat bervariasi dan dua komponen yang mempunyai harga  $R=1-1,5$  dikatakan dua kromatogram dari dua komponen tersebut terpisah 98 – 99,7% (Mulja,1995)

Faktor selektivitas ( $\alpha$ ) diperoleh dengan jalan membandingkan waktu tambat kedua komponen pada kondisi kromatografi yang sama, faktor selektivitas dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$\alpha = \frac{(t_r)_B}{(t_r)_A} \dots\dots\dots (10)$$

### 2.7.1.3 Efisiensi kolom.

Efisiensi kolom dalam kromatografi secara umum berkaitan dengan lamanya waktu komponen atau molekul yang dianalisis berada dalam kolom dan berkaitan pula dengan jumlah pelat teori. Secara kuantitatif efisiensi kolom dapat diukur dengan persamaan sebagai berikut (Johnson, 1991) :

$$N = \left( \frac{t_r}{\sigma} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_r}{w} \right)^2 \dots\dots\dots (11)$$

dengan N adalah jumlah pelat teori dan  $\sigma$  adalah standar deviasi dari puncak kromatogram, sedangkan w adalah lebar puncak yang ditentukan dengan memperpanjang garis singgung puncak sampai memotong garis alas.

### 2.7.1.4 High equivalent of A Theoretical Plate (H)

*High equivalent of A Theoretical Plate* adalah panjang kolom (dalam mm) yang diperlukan sampai terjadinya satu kali keseimbangan molekul komponen dalam fasa gerak dan fasa diam (Mulja, 1995). Harga *High equivalent of A Theoretical Plate* sebagai pengukuran kolom dirumuskan sebagai berikut:

$$\frac{1}{H} = \frac{N}{L} \dots\dots\dots (12)$$

dengan  $\frac{N}{L}$  adalah bilangan yang menunjukkan jumlah pelat teori yang efektif persatuan panjang kolom. Semakin besar harga  $\frac{N}{L}$  maka efisien kolom yang dipakai untuk pemisahan baik.

## 2.8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

*High Performance Liquid Chromatography* merupakan kromatografi cair modern yang efisiensinya sepadan dengan kromatografi gas dimana baik daya pemisahan yang tinggi dan kecepatan analisis dicapai dengan pertolongan fasa-

fasa stasioner inovatif, yang memungkinkan fasa gerak kecepatan tinggi. Dasar pemisahan pada HPLC adalah perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen sampel yang terjadi karena adanya perbedaan kesetimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak untuk senyawa-senyawa yang berbeda.

Berikut ini adalah gambaran instrumen dari HPLC



Gambar 4. Gambar instrumen HPLC

Keterangan :

- |                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| 1. Botol eluen          | 6. Kolom            |
| 2. Pompa tekanan rendah | 7&8. Pembuangan     |
| 3. Pompa tekanan tinggi | 9. Penampung efluen |
| 4. Kolom terlindung     | 10. Integrator      |

### 2.8.1 Gerbang suntik.

Injeksi sampel mempengaruhi hasil kromatogram dari HPLC. Apabila injeksi sampel tidak dilakukan dengan tepat, maka hasil kromatogram yang ditampilkan tidak memadai. Sistem injektor dengan pipa suntik merupakan pilihan yang tepat

pada HPLC khususnya untuk analisis kuantitatif, hal ini dikarenakan ketetapan jumlah volume sample yang diinjeksikan sangat penting dan hal ini dapat diantisipasi dengan injektor sistem pipa dosis (*Sample loop*). Prinsip kerja pipa dosis adalah "*Load-inject*" dimana pada keadaan pertama sampel akan masuk loop dan akhirnya dengan volume yang tidak berkurang sedikit pun segera masuk menuju kolom pemisahan.

### **2.8.2 Kolom *high performance liquid chromatography*.**

Pemisahan komponen-komponen sampel terjadi dalam kolom, sehingga kolom menjadi penentu keberhasilan pemisahan komponen-komponen sampel serta hasil akhir analisis dengan HPLC. Kolom pada HPLC dibuat tegak lurus (tidak dibuat melingkar seperti kolom pada kromatografi gas ataupun bentuk U). Hal ini dimaksudkan untuk efisiensi kolom agar didapatkan harga H (*High Equivalent of a Theoretical Plate*) minimal. Keuntungan kolom yang dibuat dengan diameter sangat kecil dengan ukuran pendek diantaranya adalah memperluas kemampuan detektor, menghasilkan resolusi yang baik, mengurangi waktu  $t_r$  dan  $t_m$  dan juga mengurangi jumlah sampel.

Fase kolom sungsang (*Reversed Phase Column*) adalah kromatografi yang fasa diamnya bersifat non polar, sedangkan fasa geraknya bersifat polar. Keuntungan menggunakan kromatografi fasa sungsang diantaranya adalah senyawa yang polar akan lebih baik pemisahannya, senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada HPLC fasa kolom normal akan dapat terpisahkan, dan dengan kromatografi fasa sungsang air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada eluen campur.

Selain kolom analitik juga terdapat kolom pelindung karena apabila kolom terus-menerus menerima suntikan sampel yang terdapat partikel padat, secara perlahan-lahan kolom akan kehilangan kemampuannya untuk melakukan pemisahan yang diinginkan (Johnson, 1991).

### **2.8.3 Oven kolom.**

Kolom HPLC diletakkan di dalam oven untuk menjaga temperatur kolom supaya stabil. Hal ini adalah sangat penting untuk memperoleh stabilitas dalam analisis dengan metode HPLC. Oven kolom yang banyak dipakai adalah dengan sistem sirkulasi udara panas yang bertekanan.

### **2.8.4 Pompa cairan.**

Terdapat tiga macam jenis pompa yang banyak dipakai pada HPLC, yaitu :

- a. *Reciprocating Pumps*
- b. *Displacement Pumps (Syringe Pumps)*
- c. *Pneumatic Pumps (Constant Pressure Pumps)*

Sistem pompa HPLC sudah diprogram untuk dapat melakukan elusi dengan satu atau lebih macam pelarut. Dikenal dua sistem pompa pada HPLC yaitu sistem elusi isokratik dan sistem elusi gradien.

### **2.8.5 Detektor.**

Detektor pada HPLC yang akan memberikan informasi tentang segala sesuatu yang diperlukan sehubungan dengan tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif dengan HPLC. Terdapat beberapa macam detektor, yaitu *Refractive Index (RI)*, *Ultra-Violet (UV)*, *Fluorescent*, *Radiochemical*, *Electrochemical*, *Near-Infra Red (Near-IR)*, *Mass Spectroscopy (MS)*, *Nuclear Magnetic Resonance (NMR)*, dan

*Light Scattering (LS)* ([www.kerouac.pharm.ukg.edu](http://www.kerouac.pharm.ukg.edu)). Detektor *Ultra-Violet (UV)* dapat digunakan untuk mengukur sampel yang dapat menyerap sinar tampak. Akan tetapi jika pelarut yang digunakan untuk fasa mobil mengandung gugus kromatofor UV maka akan memberikan sinyal latar belakang (background signal) dari fasa gerak (Ewing, 1997).

#### **2.8.6. Profil kromatogram HPLC**

Idealnya profil kromatogram HPLC merupakan suatu garis tegak lurus bagi masing-masing analit. Akan tetapi keadaan demikian tidak akan dijumpai pada pelaksanaan analisis dengan HPLC. Kromatogram HPLC merupakan relasi antara tanggapan detektor sebagai ordinat dan waktu sebagai absis pada sistem koordinat Cartesian, di mana titik nol dinyatakan sebagai saat dimulainya injeksi sampel. Kromatogram HPLC akan melebar secara ideal seperti kurva Gauss (Mulja, 1995).

#### **2.9 Interaksi Pelarut-Zat Terlarut**

Kelarutan suatu senyawa tergantung pada sifat fisika dan kimia zat terlarut dan pelarut, juga bergantung pada faktor temperatur, tekanan, pH larutan dan untuk jumlah yang lebih kecil bergantung pada hal terbaginya zat terlarut. Secara umum, zat yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar, sedangkan zat yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pelarut polar dapat bertindak sebagai pelarut menurut mekanisme berikut:



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Analitik dan Kimia Dasar Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga mulai bulan Januari 2006 sampai Mei 2006.

#### **3.2 Sampel, Bahan dan Alat**

##### **3.2.1 Sampel.**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah air limbah domestik dari kawasan Surabaya Selatan. Sampel air limbah domestik sebanyak 500 mL diambil dari selokan atau sungai kecil di sekitar daerah Surabaya Selatan dimasukkan dalam botol plastik dan disimpan pada suhu 4°C.

##### **3. 2.2 Bahan.**

Bahan-bahan kimia yang digunakan bersifat pro analisis (p.a) diantaranya adalah etinil estradiol, toluen, kloroform, karbon tetraklorida, asam asetat glasial, natrium asam asetat, natrium dihidrogenfosfat, natrium hidroksida, natrium lauril sulfat, natrium klorida, metanol, asetonitril, aquabides

##### **3.2.3 Alat.**

Pada penelitian ini digunakan seperangkat HPLC dengan detektor UV, integrator, vakum degasser, syring 25 µL, mikro pipet 100µL, kertas saring Cellulose nitrate membrane filter 0,45 µm , kertas saring whatman 40, pengaduk

magnetik, stirer plate dan pH meter, dan peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

### **3.3 Pembuatan Larutan Standar Etilin Estradiol**

Ditimbang dengan teliti 125 mg padatan etinil estradiol kemudian dilarutkan dalam metanol dan ditambahkan metanol sampai tanda batas pada labu ukur 250 mL, sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 500 ppm. Larutan standar dibuat dengan mengencerkan larutan induk dengan aquabides sehingga diperoleh larutan etinil estradiol dengan konsentrasi 1 – 5 ppm dalam metanol 1% dengan konsentrasi akhir NaCl sebesar 5 ppm dan NaLS sebesar 0,5 ppm.

### **3.4 Pembuatan Larutan Buffer**

#### **3.4.1 Pembuatan larutan asam asetat 2 M.**

Diambil 11,50 mL asam aetat glasial, kemudian ditambahkan aquabides sampai tanda batas dalam labu ukur 100 mL.

#### **3.4.2 Pembuatan larutan natrium asetat 2 M.**

Ditimbang dengan teliti 27 g natrium asetat 3 hidrat ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) dan dilarutkan dalam aquabides, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquabides sampai tanda batas.

#### **3.4.3 Pembuatan larutan natrium dihidrogenfosfat 2 M.**

Ditimbang dengan teliti 27 g natrium dihidrogenfosfat 1 hidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) dan dilarutkan dalam aquabides kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquabides sampai tanda batas.

#### **3.4.4 Pembuatan larutan natrium hidroksida 2 M.**

Ditimbang dengan teliti 8 g natrium hidroksida dan dilarutkan dalam aquabides kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan dengan aquabides sampai tanda batas.

#### **3.4.5 Pembuatan bufer asetat.**

Pembuatan bufer pH 4 digunakan campuran 8,0 mL asam asetat 2M dan 2,0 mL natrium asetat 2 M. Sedangkan bufer pH 5 digunakan campuran 3,0 mL asam asetat 2 M dan 7,0 mL natrium asetat 2 M. Kemudian di tambahkan aquabides sampai tanda batas dalam labu ukur 100 mL. Larutan tersebut masing-masing diukur dengan menggunakan pHmeter.

#### **3.4.6 Pembuatan bufer fosfat.**

Pembuatan bufer pH 6 digunakan campuran 25,0 mL natrium dihidrogen fosfat 2M dan 3,0 mL larutan natrium hidroksida 2 M, campuran dimasukkan labu ukur 100 mL kemudian diencerkan sampai tanda batas dengan aquabides. Demikian pula untuk pembuatan pH 7 dan pH 8 akan tetapi larutan natrium hidroksida 2M yang ditambahkan masing-masing sebanyak 15,0 mL dan 23,5 mL. Larutan tersebut masing-masing diukur dengan menggunakan pH meter.

#### **3.5 Pembuatan Larutan NaCl 500 ppm**

Ditimbang dengan teliti 125 mg NaCl, selanjutnya dilarutkan dalam akuabidest dan dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL. Kemudian diencerkan menggunakan aquabides hingga tanda batas.

### **3.6 Pembuatan Larutan NaLS 500 ppm**

Ditimbang dengan teliti 125 mg NaLS, selanjutnya dilarutkan dalam aquabides dan dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL. Kemudian diencerkan menggunakan aquabides hingga tanda batas

### **3.7 Pembuatan Eluen**

Untuk membuat eluen HPLC digunakan asetonitril, metanol, aquabides dengan perbandingan 3,5 : 1,5 : 4,5 (Supriyanto, 2005). Setelah dicampur dengan menggunakan pengaduk magnetik sekitar 1 jam dengan kecepatan 1500 rpm campuran eluen disaring dengan kertas saring Whatman untuk menghilangkan pengotor.

### **3.8 Pembuatan Kuva Baku Standar Etinil Estradiol**

Larutan standar dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm dengan konsentrasi akhir 0,5 ppm NaLS dan NaCl sebesar 5 ppm. Masing-masing larutan dianalisis dengan HPLC dengan menggunakan detektor UV, diukur luas areanya pada panjang gelombang 230 nm dengan laju alir 1 mL/menit. Dari data yang diperoleh dimana pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali replikasi, dibuat kurva baku standar etinil estradiol antara konsentrasi dan luas area rata-rata.

### **3.9 Optimasi parameter-parameter analitik**

Optimasi parameter-parameter analitik dilakukan secara multi variant yaitu dengan cara mengubah satu variabel parameter sementara variabel parameter yang lain dibuat tetap atau konstan.

#### **3.9.1 Pengaruh jenis pelarut organik.**

Dalam eksperimen ini akan dicoba tiga jenis pelarut organik yaitu toluen, kloroform dan karbon tetraklorida. Sebanyak 20,00 mL larutan standar etinil estradiol 3 ppm, yang sebelumnya telah ditambahkan NaCl dengan konsentrasi akhir 5 ppm dan NaLS dengan konsentrasi akhir 0,5 ppm dimasukkan ke dalam gelas beker 30 mL yang sudah berisi magnetik stirrer. Kemudian gelas beker ditutup dengan gabus. Syring yang ujungnya dihubungkan dengan jarum dan telah berisi 25 mikroliter toluen dimasukkan secara tegak lurus sampai ujung jarum masuk ke dalam larutan standar. Kemudian ujung syring ditekan sehingga toluen menggantung di ujung jarum dengan volume 3 $\mu$ L. Larutan standar diaduk dengan kecepatan 1200 rpm selama 12 menit, kemudian toluen ditarik kembali ke dalam syring. Toluene kemudian dipindah ke dalam vial, dikeringkan, dan dilarutkan kembali dengan menggunakan 100  $\mu$ L metanol 100 % dan kemudian diinjeksikan ke HPLC dan didapatkan luasan area. Prosedur yang sama dilakukan terhadap pelarut-pelarut organik yang lain. Kemudian diplot suatu grafik antara jenis pelarut organik dan luas area.

#### **3.9.2 Pengaruh kecepatan pengadukan.**

Dalam penelitian ini kecepatan pengadukan divariasikan antara 600 sampai 1500 rpm, sementara variabel yang lain dibuat konstan seperti prosedur sebelumnya.

Pelarut organik yang digunakan diperoleh dari prosedur sebelumnya. Hasil ekstraksi kemudian diinjeksikan ke dalam HPLC. Kemudian diplot grafik antara kecepatan pengadukan dengan luas area.

### **3.9.3 Pengaruh pH.**

Dalam eksperimen ini akan divariasikan pH antara 4 sampai 8 yaitu 4; 5; 6; 7; 8. Variabel yang lain dibuat konstan, pelarut organik dan kecepatan pengadukan yang digunakan diperoleh dari prosedur sebelumnya dan dilakukan ekstraksi seperti prosedur sebelumnya, kemudian hasil ekstraksi yang telah dilarutkan kembali dengan metanol 100% diinjeksikan ke dalam HPLC. Dari data yang diperoleh dibuat kurva antara luas area rata-rata dan pH.

### **3.10 Pembuatan Kurva Kalibrasi Hasil Optimasi**

Masing-masing larutan standar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm diekstraksi dengan menggunakan kondisi yang optimum yang didapatkan dari prosedur sebelumnya. Kemudian masing-masing larutan standar dianalisis dengan HPLC dengan menggunakan detektor UV, panjang gelombang 230 nm dengan laju alir 1 mL/menit. Pengukuran dilakukan tiga kali pengulangan. Dari data yang diperoleh, dibuat kurva baku standar etinil estradiol antara konsentrasi dan luas area rata-rata.

### 3.11 Penentuan Parameter-Parameter Validasi

#### 3.11.1 Uji koefisien variasi (presisi)

Presisi atau ketelitian menyatakan derajat kedapatulangan (reproducibility) yakni besarnya kesesuaian atau penyimpangan dari suatu atau setiap nilai hasil pengukuran yang dilakukan berulang-ulang pada sampel yang sama.

Presisi dinyatakan dengan nilai simpangan baku (standar deviasi = SD) dari hasil pengukuran yang berulang-ulang. Standar deviasi dapat ditentukan dari persamaan:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n-1}} \dots\dots\dots (13)$$

Keterangan:

$\bar{x}$  = nilai rata-rata

x = nilai setiap pengukuran

n = jumlah pengukuran (pegulangan)

Macam uji yang digunakan adalah uji koefisien variasi (Kv), koefisien variasi dapat dihitung dari persamaan:

$$K_v = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (14)$$

#### 3.11.2 Penentuann limit deteksi

Limit deteksi (LOD) merupakan salah satu parameter proses validasi yang menyatakan kesensivitisan instrumen dan metode analisis. LOD atau batas deteksi menyatakan besarnya kadar analit terkecil dalam sampel yang masih dapat diukur atau dideteksi dengan baik. LOD ditentukan dari persamaan (15) dan (16)

$$Y_{LOD} = Y_{bl} + 3 S_{bl} \dots\dots\dots (15)$$

$$Y_{LOD} = a + 3 S_{y/x} \dots\dots\dots (16)$$

Keterangan:

$Y_{LOD}$  = sinyal konsentrasi terkecil yang masih terdeteksi

$S_{bl}$  =  $S_{y/x}$  = standar deviasi dari sinyal blanko

$Y_{bl}$  =  $a$  = sinyal blanko (intersep dari persamaan kurva kalibrasi)

$Y_{LOD}$  yang diperoleh dimasukkan ke persamaan kurva kalibrasi sehingga diperoleh limit deteksi

### 3.11.3 Penentuan persen *recovery* (R)

Persen *recovery* menyatakan ketepatan yang merupakan kedekatan setiap nilai hasil pengukuran atau nilai rata-rata dengan nilai sebenarnya. Dinyatakan dengan perbandingan antara konsentrasi rata-rata dengan konsentrasi awal. Hasil pengukuran akurat jika nilai % *recovery* sebesar 100%.

$$R = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100\% \dots\dots\dots (17)$$

Keterangan:

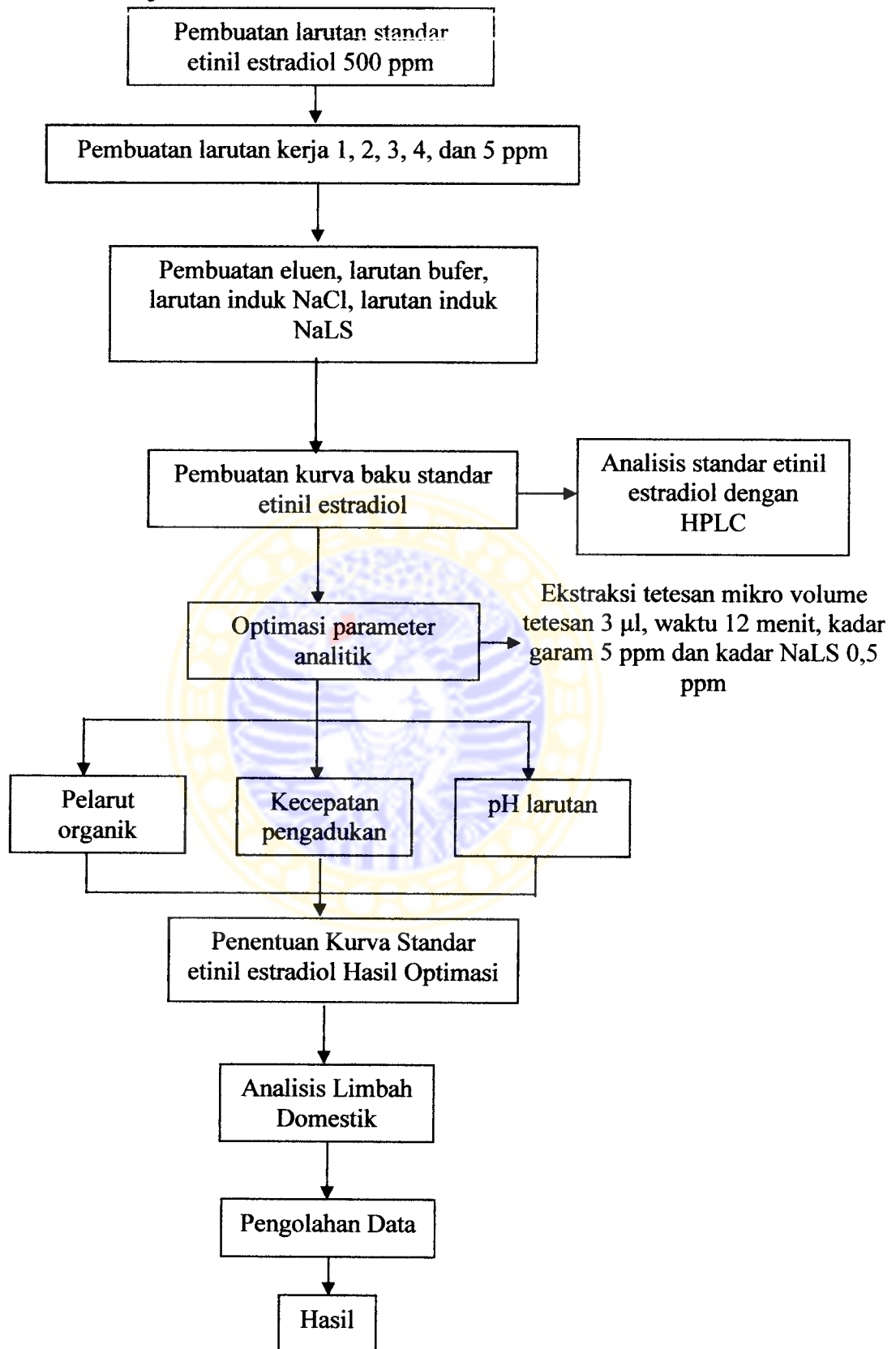
$\bar{x}$  = nilai (konsentrasi) rata-rata hasil pengukuran

$\mu$  = nilai (konsentrasi) sebenarnya

### 3.11.4 Perhitungan *enrichment factor*

*Enrichment factor* menjelaskan seberapa besar pemekatan yang terjadi selama proses ekstraksi. Terdapat dua rumus yang digunakan dalam menentukan seberapa



**3.13 Skema kerja**

## **BAB IV**

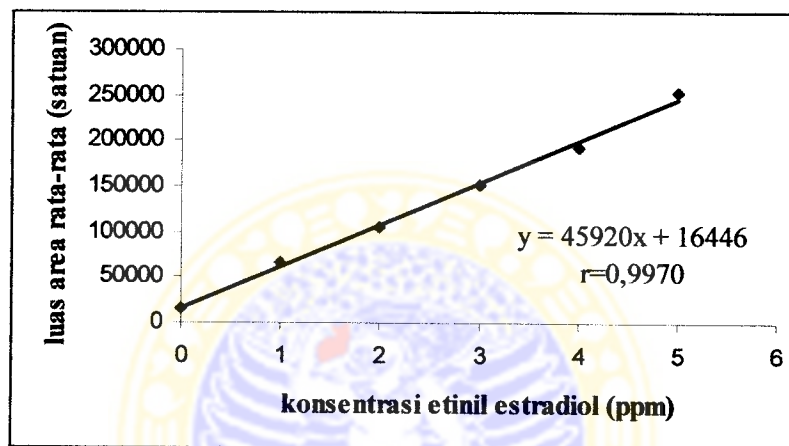
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Pembuatan Kurva Baku Tanpa EMTT**

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan mengukur larutan standar etinil estradiol variasai konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm dan 5 ppm menggunakan instrumen HPLC dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 230 nm. Senyawa etinil estradiol keluar pada waktu retensi ( $t_r$ )  $\pm$  5 menit dengan laju alir 1 ml/menit menggunakan eluen asetonitril, aquabides, dan metanol dengan perbandingan 3,5 : 4,5 : 1,5 (Supriyanto, 2005). Larutan standar yang digunakan terlebih dahulu ditambahkan NaCl dan NaLS dengan konsentrasi akhir yang terkandung dalam larutan standar masing-masing sebesar 5 ppm dan 0,5 ppm. Penambahan ini dimaksudkan untuk menyamakan larutan standar dengan kondisi sampel, dimana matriks dalam standar seharusnya mendekati kondisi sampel (Somenath, 2003). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nugroho (2001) konsentrasi NaLS sebesar 0,3744 pada pagi hari dan 0,5990 ppm pada sore hari. Sedangkan kadar garam di lingkungan sebesar 0,5 ppm ([www.waternetonline.ihe.nl/aboutWN/pdf/palamuleni&al.pdf](http://www.waternetonline.ihe.nl/aboutWN/pdf/palamuleni&al.pdf), 11 Januari 2006). Pengukuran ini dilakukan 3 kali replikasi. Berdasarkan nilai-nilai luas area yang diperoleh, dilakukan penentuan persamaan regresi. Data luas area rata-rata larutan standar etinil estradiol dapat dilihat pada tabel 4.1:

Tabel 4.1 Data hubungan antara luas area dengan konsentrasi etinil estradiol

Konsentrasi (ppm)	Luas area rata-rata (satuan)	Koefisien variasi (%)
1	66923,33	0,58
2	105487,33	0,66
3	152831,33	1,52
4	193036,33	0,63
5	252748,33	3,32



Gambar 5. Hubungan antara luas area dan konsentrasi

Dari kurva standar tersebut diperoleh persamaan regresi linear  $y=45920x + 16446$ , dengan  $y$  adalah luas area dan  $x$  adalah konsentrasi larutan standar etinil estradiol, sedangkan koefisien korelasinya ( $r$ ) sebesar 0,9970. Koefisien variasi dengan nilai yang cukup rendah menunjukkan tingginya ketelitian terhadap pengukuran tersebut. Untuk melihat apakah ada pemekatan terhadap ekstraksi etinil estradiol dengan metode EMTT, maka data yang diperoleh dari kurva standar tanpa EMTT dibandingkan dengan kurva standar hasil ekstraksi dengan EMTT.

## **4.2 Optimasi Parameter –Parameter Analitik**

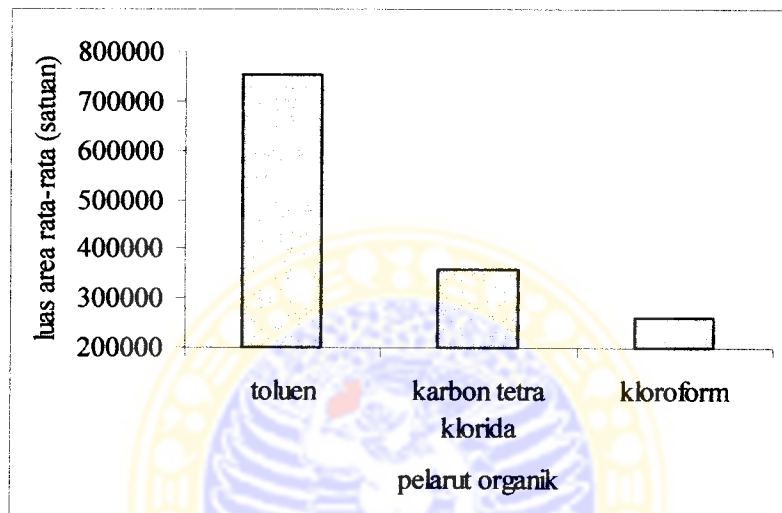
Untuk mendapatkan hasil yang optimum pada proses ekstraksi etinil estradiol dengan metode EMTT, maka diperlukan kondisi-kondisi yang optimum pada proses analisisnya antara lain jenis pelarut organik, kecepatan pengadukan dan pH larutan. Larutan standar yang digunakan dalam proses optimasi adalah larutan standar 3 ppm yang telah ditambahkan sejumlah NaCl dan NaLS dengan konsentrasi akhir dalam larutan sebesar masing masing 5 dan 0,5 ppm.

### **4.2.1 Optimasi pelarut organik**

Penggunaan pelarut yang sesuai pada proses ekstraksi sangat penting untuk meningkatkan selektivitas terhadap ekstraksi senyawa yang dimaksud, oleh karena itu diperlukan optimasi beberapa pelarut. Pelarut yang dipilih haruslah yang tidak saling campur dengan air, karena analit yang akan diekstraksi berada pada fasa air. Dimana jika perbedaan kelarutan zat tersebut semakin besar, maka semakin sempurna pemisahan tersebut (Khopkar, 1990). Sebelum dipilih tiga pelarut, yaitu toluen, karbon tetra klorida, dan kloroform telah dilakukan uji pendahuluan terhadap beberapa jenis pelarut organik diantaranya adalah butanol, n-heksana dan n-heptana. Pada proses ekstraksi menggunakan pelarut butanol, tetesan terlarut pada fasa air sehingga tidak dipilih butanol sebagai pelarut pengeksrak. Sedangkan untuk n-heksana dan n-heptana setelah dilakukan proses ekstraksi tidak muncul puncak pada waktu retensi dimana etinil estradiol muncul pada kromatogram. Selain itu pelarut yang dipilih haruslah mempunyai tetesan yang stabil, sehingga ini akan meningkatkan efisiensi ekstraksi. Tabel 4.2 memuat data luasan area yang diperoleh dari optimasi tiga pelarut organik.

Tabel 4.2 Pengaruh pelarut organik terhadap luas area rata-rata

Pelarut Organik	Luas area rata-rata (satuan)	Koefisien Variasi (%)
Toluen	752858,67	6,45
Karbon tetra klorida	358653,00	6,50
Kloroform	276607,33	6,79



Gambar 6. Grafik hubungan pelarut organik dan luas area rata-rata

Dari grafik diatas dapat diketahui bahwa toluen dapat mengekstraks etinil estradiol dengan baik yang digambarkan dengan besarnya rata-rata luas area yang dihasilkan jika dibandingkan pelarut yang lain. Hal ini dikarenakan toluen mempunyai nilai kelarutan dalam air yang paling kecil diantara ketiga pelarut, sehingga tetesan yang dibentuk lebih stabil. Selain itu toluen memiliki nilai Log  $K_{ow}$  yang lebih besar dibanding dengan kedua pelarut yang lain, hal ini menyebabkan etinil estradiol lebih mudah terekstrak ke toluen. Tegangan permukaan yang besar juga mempengaruhi kestabilan tetesan, dimana dalam proses ekstraksi ini terdapat pengadukan, sehingga perlu dipilih pelarut organik

yang mempunyai nilai tegangan permukaan yang besar. Hal ini bertujuan agar selama proses ekstraksi pelarut organik tetap stabil walaupun dengan adanya pengadukan. Dari optimasi tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa pelarut yang sesuai untuk poses ekstraksi tetes mikro etinil estradiol adalah toluen. Tabel 4.3 memuat karakteristik pelarut yang digunakan dalam ekstraksi etinil estradiol.

Tabel 4.3 Karakteristik pelarut organik

Pelarut organik	Sifat fisik		
	Log P <sub>ow</sub>	Tegangan permukaan (N/m)	Kelarutan dalam air (mg/L; 25°C)
Toluen	2,79	0,0284	0526
Kloroform	1,98	0,0271	8000
CCl <sub>4</sub>	2,64	0,0270	0785

#### 4.2.2 Optimasi kecepatan pengadukan

Pengadukan dalam ekstraksi tetes mikro dimaksudkan untuk mempercepat transfer analit dari fasa air menuju fasa organik, sehingga dapat mengurangi waktu ekstraksi. Pada penelitian ini kecepatan pengadukan divariasikan yaitu 600 rpm, 900 rpm, 1200 rpm dan 1500 rpm. Tabel 4.4 memuat data yang menunjukkan pengaruh kecepatan pengadukan terhadap luas area.

Tabel 4.4 Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap luas area rata-rata

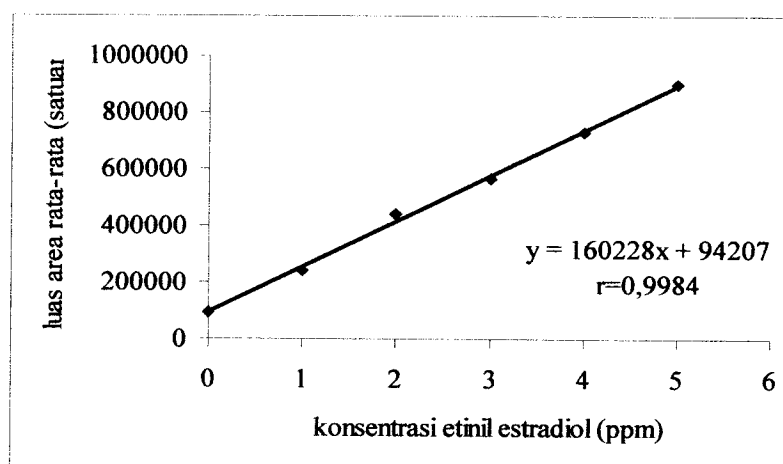
Kecepatan pengadukan (rpm)	Luas area rata-rata (satuan)
600	258305,00
900	392504,67
1200	752858,67
1500	803346,67
1800	706872,33

### 4.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi Etilin Estradiol Hasil Optimasi

Pembuatan kurva kalibrasi etinil estradiol hasil optimasi dilakukan dengan mengekstraksi larutan standar 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm dengan kondisi optimum yang didapatkan dari prosedur sebelumnya. Pembuatan kurva kalibrasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya korelasi linier antara konsentrasi etinil estradiol dengan signal instrumen (luas area) dan mengetahui adanya pemekatan dalam proses ekstraksinya dengan cara membandingkan data pada kurva hasil optimasi (kurva kalibrasi) dengan kurva standar etinil estradiol tanpa ekstraksi. Data yang digunakan untuk pembuatan kurva kalibrasi dapat dilihat pada tabel 4.6.

Tabel 4.6 Data kurva kalibrasi hasil optimasi

Konsentrasi (ppm)	Luas area rata-rata (satuan)	Koefisien variasi (%)
1	242279,7	10,28
2	438420,0	12,19
3	565682,7	13,42
4	730888,3	09,31
5	897187,0	06,83



Gambar 9. Kurva kalibrasi hasil optimasi

Dari data kurva kalibrasi larutan standar etinil estradiol dengan ekstraksi mikro tetesan tunggal jika dibandingkan dengan data kurva standar tanpa ekstraksi menunjukkan bahwa pemekatan terjadi pada penentuan etinil estradiol dengan metode ekstraksi mikro tetesan tunggal. Persamaan regresi yang didapatkan dari kurva kalibrasi ini digunakan untuk menentukan konsentrasi etinil estradiol dalam sampel, menentukan *recovery* (akurasi), dan limit deteksi (LOD) metode.

#### 4.4 Penentuan Parameter-Parameter Validasi

##### 4.4.1 Ketepatan (akurasi)

Ketepatan analisis dalam suatu pengukuran dapat dinyatakan dalam persen *recovery*, dimana akurasi tinggi jika persen *recovery* mempunyai harga hampir 100 %. Tabel 4.7 menunjukkan persen *recovery* dari larutan standar.

Tabel 4.7 Data persen *recovery* larutan standar

Konsentrasi (ppm)	<i>Recovery</i> (%)
1	92,40
2	107,40
3	98,08
4	99,34
5	100,23

Dari tabel diatas dihasilkan *recovery* rata-rata sebesar 99,49%, nilai tersebut mendekati 100% sehingga dapat disimpulkan bahwa aplikasi metode EMTT pada penentuan etinil estradiol mempunyai akurasi yang baik.



#### 4.4.2 Ketelitian (presisi)

Ketelitian biasanya dinyatakan dengan harga koefisien variasi (KV). Dimana metode dikatakan baik jika harga KV bernilai kurang dari 3%. Tabel 4.8 memuat nilai KV dari larutan standar yang diekstraksi pada kondisi optimum.

Tabel 4.8 Data koefisien variasi larutan standar

Konsentrasi (ppm)	KV(%)
1	10,28
2	12,19
3	13,42
4	09,31
5	06,83

Besarnya nilai koefisiensi variasi pada metode ini merupakan kelemahan dari metode ini, hal ini dikarenakan metode ini masih dilakukan secara manual sehingga tingkat ketelitiannya relatif kecil.

#### 4.4.3 Limit Deteksi

Limit deteksi digunakan untuk menyatakan kadar analit terkecil dalam sampel yang masih dapat diukur (dideteksi) oleh instrumen atau metode analisis yang baik. Dimana semakin kecil nilai limit deteksi (LOD) suatu metode atau instrumen tersebut, maka semakin sensitif pula instrumen atau metode tersebut.

Dari hasil perhitungan didapat limit deteksi metode EMTT sebesar 0,31 ppm, sedangkan limit deteksi awal, yaitu persamaan standar etinil estradiol tanpa ekstraksi sebesar 0,42 ppm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa dengan adanya metode EMTT sebagai langkah preparasi sampel pada penentuan kadar etinil estradiol akan meningkatkan sensitivitas pada instrumen.

#### 4.5 Analisis Sampel

Hasil optimasi yang telah dilakukan kemudian diaplikasikan pada sampel. Sampel yang digunakan diambil dari air selokan kawasan Surabaya Selatan yang diambil di tiga titik yaitu Kecamatan Sawahan, Kecamatan Karang Pilang, dan Kecamatan Wonokromo. Pengambilan di tiga lokasi ini didasarkan pada pengguna pil KB terbanyak menurut data dari BKKBN. Sampel diekstraksi menggunakan kondisi optimum yang didapatkan sebelumnya. Tabel 4.9 memuat data dari ekstraksi sampel di ketiga tempat tersebut.

Tabel 4.9 Data analisis sampel

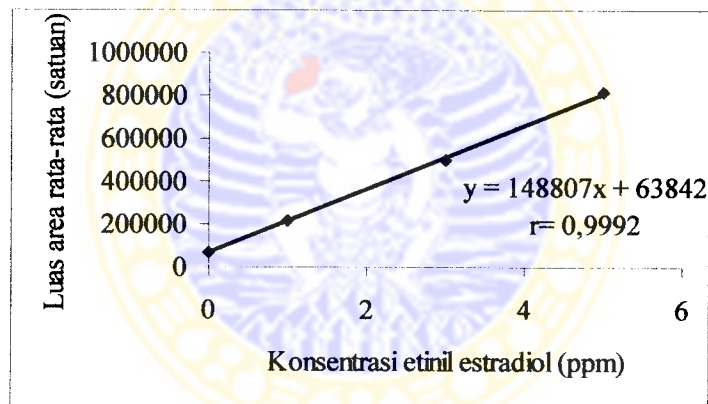
Sampel	Luas area rata-rata (satuan)
Kecamatan Sawahan	69849,00
Kecamatan Wonokromo	57703,33
Kecamatan Karang Pilang	19136,00

Untuk mengetahui konsentrasi etinil estradiol dalam sampel dilakukan dengan cara memasukkan luas area rata-rata sampel ke persamaan kurva kalibrasi standar etinil estradiol hasil optimasi sebagai sumbu y. Dari hasil perhitungan didapatkan bahwa masing-masing sampel bernilai negatif, hal ini berarti tidak terdeteksinya senyawa etinil estradiol walaupun terdapat signal pada kromatogram. Hal ini diakibatkan tingginya harga Log  $K_{ow}$  etinil estradiol menyebabkan senyawa ini mudah terabsorpsi pada sedimen. Sehingga dimungkinkan memang etinil estradiol yang terkandung dalam limbah cair kecil. Selain itu sensitivitas instrumen HPLC yang digunakan relatif rendah, karena detektor yang digunakan adalah UV-Vis.

Untuk menentukan *recovery* (%) dari sampel dilakukan metode spiking, yaitu dengan menambahkan sejumlah analit dalam sampel sehingga diperoleh konsentrasi akhir analit dalam sampel sebesar masing-masing 1 ppm, 3 ppm, dan 5 ppm. Tabel 4.10 menunjukkan luas area hasil spiking beserta *recovery* (%)

Tabel 4.10 Data metode spiking untuk sampel Kecamatan Sawahan

Konsentrasi (ppm)	Luas area rata-rata (satuan)	<i>Recovery</i> (%)
1	21298,33	78,07
3	496964,67	83,78
5	814527,67	89,91



Gambar 10. Grafik hubungan konsentrasi dengan luas area rata-rata

Tabel 4.11 memuat data luas area rata-rata hasil spiking beserta *recovery*.

Tabel 4.11 Data metode spiking untuk sampel Kecamatan Wonokromo

Konsentrasi (ppm)	Luas area rata-rata (satuan)	<i>Recovery</i> (%)
1	22060,00	81,66
3	488922,00	82,11
5	768531,33	84,17

Dari Tabel diatas maka pada sampel Kecamatan Sawahan mempunyai *recovery* (%) rata-rata sebesar 83,92 % sedangkan untuk sampel Kecamatan Wonokromo sebesar 82,65 % dan untuk sampel Karang Pilang sebesar 85,57 %. Dengan *recovery* yang rendah dibandingkan dengan *recovery* pada saat ekstraksi larutan standar, maka dapat dikatakan bahwa matrik yang terdapat pada lingkungan mempengaruhi proses ekstraksi etinil estradiol dengan metode EMTT.

#### 4.5.1 Enrichment factor

*Enrichment factor* digunakan untuk melihat seberapa besar pemekatan yang terjadi pada saat proses ekstraksi. Menurut perhitungan (*teoretical enrichment factor*), terjadi pemekatan selama proses ekstraksi yaitu sebesar 200 kali. Sehingga konsentrasinya akan menjadi lebih pekat 200 kali dari konsentrasi awalnya. Sedangkan pemekatan sebenarnya, diperoleh pemekatan sebesar 198,98 kali. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan, bahwa selama proses ekstraksi terjadi pemekatan yang hampir sama dengan pemekatan yang seharusnya terjadi yakni 200 kali. Dan dapat dikatakan pemekatan yang terjadi pada EMTT sangat baik karena  $EF_{tr}$  mendekati  $EF_{th}$ .

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. kondisi optimum untuk ekstraksi etinil estradiol dengan metode EMTT yaitu menggunakan pelarut organik toluen dengan waktu ekstraksi 12 menit, kecepatan pengadukan 1500 rpm dengan pH larutan sebesar 5,
2. Metode EMTT hasil optimasi dapat digunakan untuk analisis etinil estradiol dalam sampel limbah domestik cair dengan akurasi yang masih perlu ditingkatkan.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan otomatisasi dalam metode Ekstraksi Mikro Tetesan Tunggal sehingga dapat meningkatkan ketelitian dalam proses ekstraksinya. Selain itu perlu digunakan instrumen yang mempunyai sensitifitas lebih tinggi dalam analisis etinil estradiol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bahramifar, Naader, Yadollah Yamini, Shahab Shariati-Feizabadi, Mojtaba shamsipur, 2004, *Trace analysis of methyl tert-butyl ether in water samples using headspace solvent microextraction and gas chromatography-flame ionization detection*, *Journal of Chromatography A*, Vol 1042, 211-217
- Batlle, R., and Cristina Nerin, 2004, *Application of Single-Drop Microextraction to Determination of Dialkyl Phthalate Esters in Food Simulans*, *Journal of Chromatography A*, Vol 1045, 29-35
- Braun P., M. Moeder, St. Schrader, P. Propp, P. Kusch, W. Engewald, 2003, *Trace Analysis of Technical Nonylphenol, Bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Wastewater Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, Vol 988, 41-51
- Cespedes, R., Mira Petrovic, Demetrio Raldua, Ursula Saura, Benjamin Pina, Silvia Lacorte, Paula Viana, Damia Barcelo, 2003, *Integrated Procedure for Determination of Endocrine-Disrupting Activity in Surface Waters and Sediments by Use of The Biological Technique Recombinant Yeast Assay and Chemical Analysis by LC-ESI-MS*, *Anal Bional Chem*, Vol 378, 697-708
- Colombini, V., Chrystelle Bancon-Montigny, Lu Yang, Paulette Maxwell, Ralph E. Sturgeon, Zoltan Mester, 2004, *Headspace Single-Drop Microextraction for The Detection of Organotin Compounds*, *Talanta*, Vol 63, 555-560
- Das P., Manju Gupta, Archana J., Krishna K. V., 2003, *Single Drop Microextraction or Solid Phase Microextraction- Gas Chromatography- Mass Spectrometry for Determination of Iodine in Pharmaceuticals, Iodized Salt, Milk Powder and Vegetables Involving Conversion Into 4-Iodo-N,N-Dimethylaniline*, *Journal of Chromatography A*, Vol 1023, 33-39
- Day, R.A., A.L. Underwood, 1998, *Analisis Kimia Kuantitatif*, edisi ke enam, Penerbit erlangga, Jakarta
- Durant, A.A., C.A. Fente, C.M. Franco, B.I. Vazquez, S. Mayo, A. Cepeda, 2002, *Development of a diphasic dialysis method for the extraction/purification of residues of ethinylestradiol in hair of cattle, and determination by gas chromatography-tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, Vol 766, 251-256
- Ewing, G.W., 1997, *Analytical Instrumentation Handbook*, second edition, revised and expanded, Marcel Dekker, Inc, New York

- Gil, S., Sandra F., Isela L., Carlos B., 2004, ***Determination of Methylmercury by Electrothermal atomic absorption Spectrometry Using Headspace Single-Drop Microextraction with in Situ Hydride Generation***, *Spectrochimica Acta*, Part B Vol 60,145-150
- He, Y., dan Lee, H.K., 1997, ***Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe***, *Anal. Chem*, Vol 69, 4634-4640
- Johnson, E.L., dan Robert S.,1991, ***Dasar Kromatografi Cair***, Penerbit ITB, Bandung
- Jurgens, M. D., A. C. Johnson, and R. J. Williams. 1999. ***Fate and behavior of steroid oestrogens in rivers: a scoping study. R&D Technical Report Environment Agency, London, United Kingdom*** P161
- Kaykhaili, M., Saeed Nazari, Mahmood Chamsaz, 2004, ***Determination of Aliphatic Amines in Water by Gas Chromatography Using Headspace Solvent Microextraction***, *Talanta*, Vol 65, 223-228
- Khopkar, S.M, 1990, ***Konsep Dasar Kimia Analitik***, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- Kuster M., Maria Jose Lopez de Alda, Damia Barcelo, 2004, ***Analysis and Distribution of Estrogens and Progestogens in Sewage Sludge, soil and Sediments***, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 23, No. 10-11
- Lambropoulou, D.A, Elefteria Psillakis, Triantafyllos A, Albanis, 2004, ***Single-Drop Microextraction for The Analysis of Organophosphorous Insecticides in Water***, *Analytica Chimica Acta*, Vol 561, 205 – 211
- Li, ning, Chunhui, Deng, Xinying, Yin, Ning Yao, Xizhong Shen, Xiangmin Zhang, 2005, ***Gas Chromatography-mass Spectrometric Analysis of Hexanal And Heptanal In Human Blood by Headspace Single-drop Microextraction With Droplet Derivatization***, *Journal Biochemistry*
- Lindsay, Sandie, 1992, ***High Performance Liquid Chromatography***, second edition, John Wiley&Son Ltd., England
- Liu, H. dan Dasgupta, P.K., 1996, ***Analytical Chemistry in A Drop Solvent Extraction In A Microdrop***. *Analytical Chemistry*, Vol 68, 1827 – 1821
- Lopez de Alda, Maria J., Damia Barcelo,2001, ***Use of Solid-Phase Extraction in Various of Its Modalities for Sample Preparation in The Determination of Estrogens and Progestogens in Sediment and Water***,*Journal of Chromatography A*, Vol 938, 145-153

**Lampiran 1 :****Pembuatan Larutan**

- a. Larutan induk etinil estradiol (ETE) 500 ppm sebanyak 100 mL

$$\begin{aligned} 500 \text{ ppm} &= 500 \text{ mg/L} \\ &= 500 \text{ mg}/1000\text{mL} \\ &= 125 \text{ mg}/250 \text{ mL} \end{aligned}$$

etinil estradiol sebanyak 125 mg dilarutkan dalam 250 mL metanol

- b. Pembuatan larutan standar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dari larutan induk 500 ppm

Larutan standar yang digunakan mengandung NaCl dengan konsentrasi akhir 5 ppm, NaLS dengan konsentrasi akhir 0,5 ppm dengan kadar metanol sebesar 1%.

Tabel berikut memuat berapa volume yang harus ditambahkan dalam labu ukur 100 mL yang kemudian ditambahkan aquabides sampai tanda batas.

Konsentrasi etinil estradiol (ppm)	Larutan ETE 500 ppm (mL)	Larutan NaCl 500 ppm (mL)	Larutan NaLS 500 ppm ( $\mu\text{L}$ )	Metanol (mL)
1	0,2	1	100	0,8
2	0,4	1	100	0,6
3	0,6	1	100	0,4
4	0,8	1	100	0,2
5	1	1	100	0

- c. Larutan induk NaCl 500 ppm sebanyak 250 mL

$$\begin{aligned} 500 \text{ ppm} &= 500 \text{ mg/L} \\ &= 500 \text{ mg}/1000\text{mL} = 125 \text{ mg}/250\text{mL} \end{aligned}$$

NaCl sebanyak 125 mg dilarutkan dalam 250 mL aquabides



d. Larutan induk NaLS 500 ppm

$$500 \text{ ppm} = 500 \text{ mg/L}$$

$$= 500 \text{ mg}/1000\text{mL}$$

$$= 125 \text{ mg}/250\text{mL}$$

NaLS sebanyak 125 mg dilarutkan dalam 250 mL aquabides



**Lampiran 2:****a. Data kurva standar etinil estradiol tanpa ETM**

Keterangan	Luas area (satuan)				
	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm
Replikasi 1	66662	105066	153885	193958	262323
Replikasi 2	67374	105105	154436	193501	246604
Replikasi 3	66734	106291	150173	191650	249318
Jumlah	200770	316462	458494	579109	758245
Rata-rata	66923,33	105487,33	152831,33	193036,33	252748,33
SD	39194	696,26	2318,6	1222,15	8402,20
Kv (%)	0,58	0,66	1,52	0,63	3,32

**b. perhitungan limit deteksi (LOD)**

Persamaan kurva standar etinil estradiol

$$y = 45920x + 16446$$

x	y	$\hat{y}$	$(y - \hat{y})^2$
1	66923,33	62366	20769256,73
2	105487,33	108286	7832553,76
3	152831,33	154206	1889717,60
4	193036,33	200126	50263420,71
5	252748,33	246046	44921227,43
			$\Sigma = 125676176,2$

Keterangan :

x adalah konsentrasi dalam ppm

y merupakan luas area rata-rata dari masing-masing konsentrasi

$\hat{y}$  diperoleh dengan cara mensubstitusikan x ke persamaan regresi  $y = 45920x + 16446$

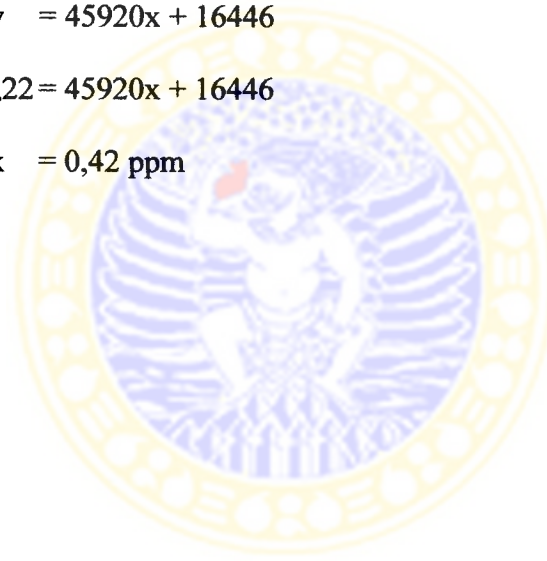
$$\begin{aligned} S_{y/x} &= \sqrt{\frac{(y - \hat{y})^2}{n-2}} \\ &= \sqrt{\frac{125676176,2}{5-2}} \\ &= 6472,40 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y_{\text{LOD}} &= Y_{\text{bl}} + 3S_{\text{bl}} \\ &= 16446 + (3 \times 6472,40) \\ &= 35863,22 \end{aligned}$$

$$y = 45920x + 16446$$

$$35863,22 = 45920x + 16446$$

$$x = 0,42 \text{ ppm}$$



**Lampiran 3:****Data optimasi parameter-parameter analitik****a. pelarut organik**

Keterangan	Luas area (satuan)		
	Toluen	Kloroform	CCl <sub>4</sub>
Replikasi 1	804266	257672	383650
Replikasi 2	746598	295244	354850
Replikasi 3	707712	276906	337459
Jumlah	2258576	829722	1075959
Rata-rata	752858,67	276607,33	358653
SD	48580,51	18787,78	23329,14
Kv (%)	6,45	6,79	6,50

**b. kecepatan pengadukan**

Keterangan	Luas area (satuan)				
	600 rpm	900 rpm	1200 rpm	1500 rpm	1800 rpm
Replikasi 1	207249	392422	804266	819951	742826
Replikasi 2	268142	464896	746598	708289	758613
Replikasi 3	299524	320196	707712	881800	619178
Jumlah	774915	1177514	2258576	2410040	2120617
Rata-rata	258305	392504,67	752858,67	803346,67	706872,33
SD	46917,15	72350,03	48580,50	87929,15	76354,62
Kv (%)	18,16	18,43	10,95	10,95	10,80

**c. pH larutan**

Keterangan	Luas area (satuan)				
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
Replikasi 1	424977	605141	496563	390826	191479
Replikasi 2	459989	587908	470127	305629	167389
Replikasi 3	418304	504000	464810	324428	161280
Jumlah	1303270	1697049	1431500	1020883	520148
Rata-rata	434423,33	565683	477166,67	340294,33	173382,67
SD	22390,50	54109,50	17006,79	44759,77	15966,77
Kv (%)	5,15	9,56	3,56	9,56	9,21

**Lampiran 4:****Data kurva kalibrasi hasil optimasi**

Keterangan	Luas area (satuan)				
	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm
Replikasi 1	225455	464625	522178	590779	830130
Replikasi 2	230482	376911	521481	692397	950278
Replikasi 3	270902	473724	653389	809489	911153
Rata-rata	242279,70	438420	565682,70	730888,30	897187
SD	24914,77	53462,28	75959,71	68074,98	61279,46
Kv (%)	10,28	12,19	13,42	9,31	6,83

## a. Perhitungan LOD

Persamaan kurva kalibrasi etinil estradiol hasil optimasi

$$y = 160228x + 94207$$

x	y	$\hat{y}$	$(y - \hat{y})^2$
1	242279,70	254435	147751318,10
2	438420	414663	564395049
3	565682,70	574891	84792788,89
4	730888,30	735119	17898822,49
5	897187	895347	3385600
			$\Sigma = 811452378,50$

Keterangan :

x adalah konsentrasi dalam ppm

y merupakan luas area rata-rata dari masing-masing konsentrasi

$\hat{y}$  diperoleh dengan cara mensubstitusikan x ke persamaan regresi  $y =$

$$160228x + 94207$$

$$\begin{aligned}
 S_{y/x} &= \sqrt{\frac{(y - \hat{y})^2}{n-2}} \\
 &= \sqrt{\frac{811452378,20}{5-2}} \\
 &= 16446,4
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y_{\text{LOD}} &= Y_{\text{bl}} + 3S_{\text{bl}} \\
 &= 94207 + (3 \times 16446,4) \\
 &= 143546,20
 \end{aligned}$$

$$y = 160228x + 94207$$

$$143546,20 = 160228x + 94207$$

$$x = 0,30 \text{ ppm}$$

b. Perhitungan *recovery*

*Recovery* dapat dihitung dengan rumus:

$$R = \frac{\bar{x}}{\mu} \times 100\%$$

$\bar{x}$  diperoleh dengan cara mensubstitusikan luas area dari masing-masing

konsentrasi ke persamaan kurva kalibrasi etinil estradiol hasil optimasi

( $y = 160228x + 94207$ ), sedangkan  $\mu$  adalah konsentrasi sebenarnya

✓ Konsentrasi 1 ppm

$$242279,70 = 160228x + 94207$$

$$x = 0,92 \text{ ppm}$$

$$R = \frac{0,924}{1} \times 100\% = 92,4 \%$$

✓ **Konsentrasi 3 ppm**

$$565682,70 = 160228x + 94207$$

$$x = 2,94 \text{ ppm}$$

$$R = \frac{2,94}{3} \times 100\% = 98,08 \%$$

✓ **Konsentrasi 5 ppm**

$$897187 = 160228x + 94207$$

$$x = 5,01 \text{ ppm}$$

$$R = \frac{5,01}{5} \times 100\% = 100,23 \%$$

R rata-rata untuk konsentrasi 1, 3, 5 ppm adalah :

$$R \text{ rata-rata} = \frac{92,4\% + 98,08\% + 100,23\%}{3} = 97,57\%$$

**Lampiran 5 :****Data sampel****a. Sampel Kecamatan Sawahan**

- Sampel

Replikasi ke	Luas area (satuan)
I	69849
II	0
III	0
Rata-rata	69849

- Data Spiking

Keterangan	Luas area (satuan)		
	1 ppm	3 ppm	5 ppm
Replikasi 1	222617	537130	856878
Replikasi 2	201177	564838	768922
Replikasi 3	234101	388926	817783
Jumlah	657895	1490894	2443583
Rata-rata	219298,33	496964,67	814527,67
SD	16711,00	94584,34	44068,26
Kv (%)	7,62	19,03	5,4
recovery (%)	78,07	83,78	89,91

$$R \text{ rata-rata} = \frac{78,07\% + 83,78\% + 89,91\%}{3} = 83,92\%$$

**b. Sampel Kecamatan Wonokromo**

- Sampel

Replikasi ke	Luas area (satuan)
I	22434
II	67148
III	83528
Rata-rata	57703,33



- Data Spiking

Keterangan	Luas area (satuan)		
	1 ppm	3 ppm	5 ppm
Replikasi 1	294451	566886	771778
Replikasi 2	200459	421560	797048
Replikasi 3	180270	478320	736768
Jumlah	675180	14466766	2305594
Rata-rata	225060	488922	768531,33
SD	60936,29	73240,79	30270,86
Kv (%)	27,07	14,98	3,93
recovery (%)	81,66	82,11	84,17

$$R \text{ rata-rata} = \frac{81,66\% + 82,11\% + 84,17\%}{3} = 82,64\%$$

c. Sampel Kecamatan Karang Pilang

- Sampel

Replikasi ke	Luas area (satuan)
I	19136
II	0
III	0
Rata-rata	19136

- Data spiking

Keterangan	Luas area (satuan)		
	1 ppm	3 ppm	4 ppm
Replikasi 1	213642	399565	806595
Replikasi 2	249444	443680	845823
Replikasi 3	241650	567194	810437
Jumlah	704736	1410439	2462855
Rata-rata	234912	470146,33	820951,67
SD	18828,07	86892,00	21624,70
Kv (%)	8,01	18,48	2,6
recovery (%)	87,80	78,2	90,71

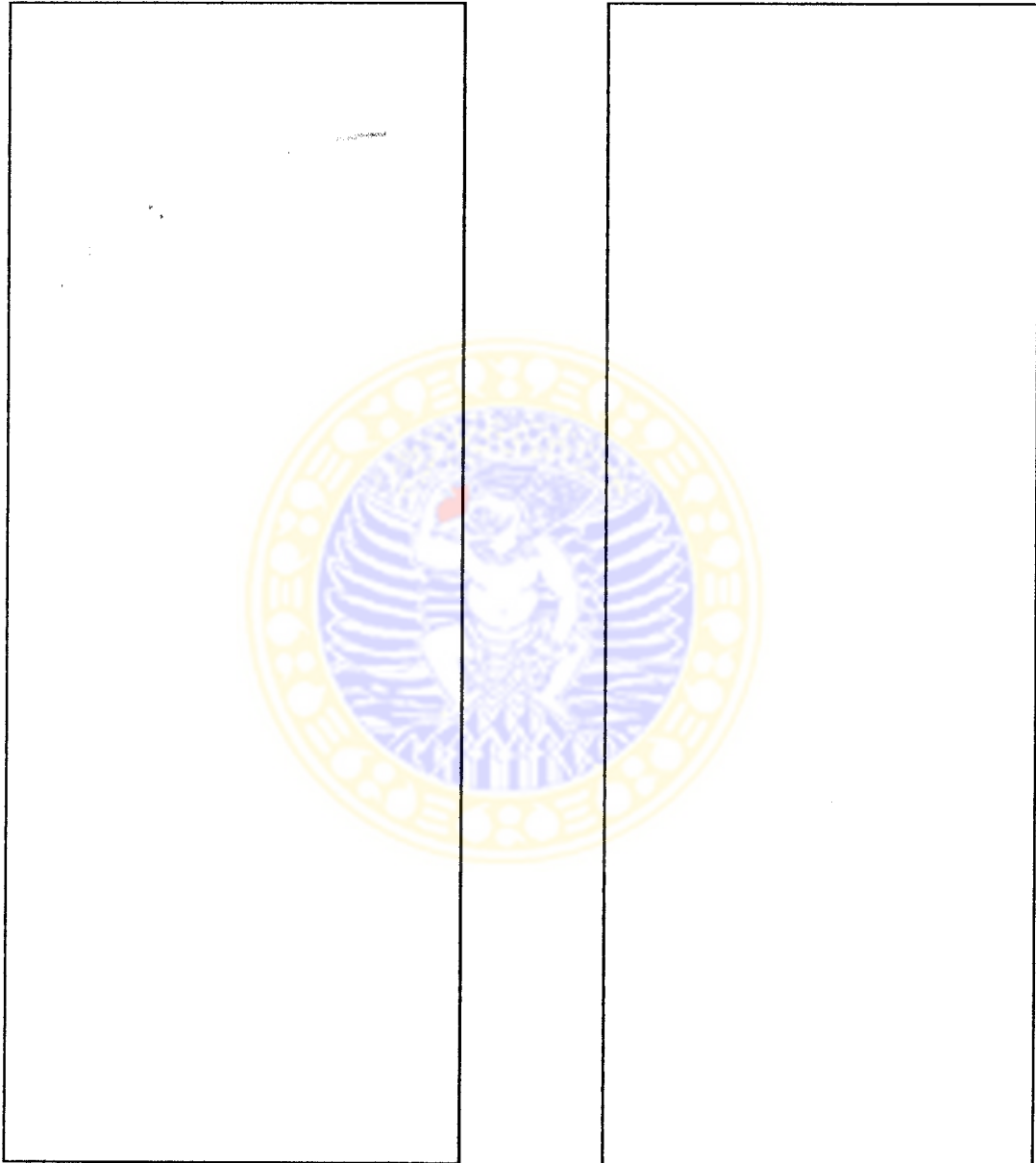
$$R \text{ rata-rata} = \frac{87,80\% + 78,2\% + 90,71\%}{3} = 86,17\%$$

**Lampiran 6:**

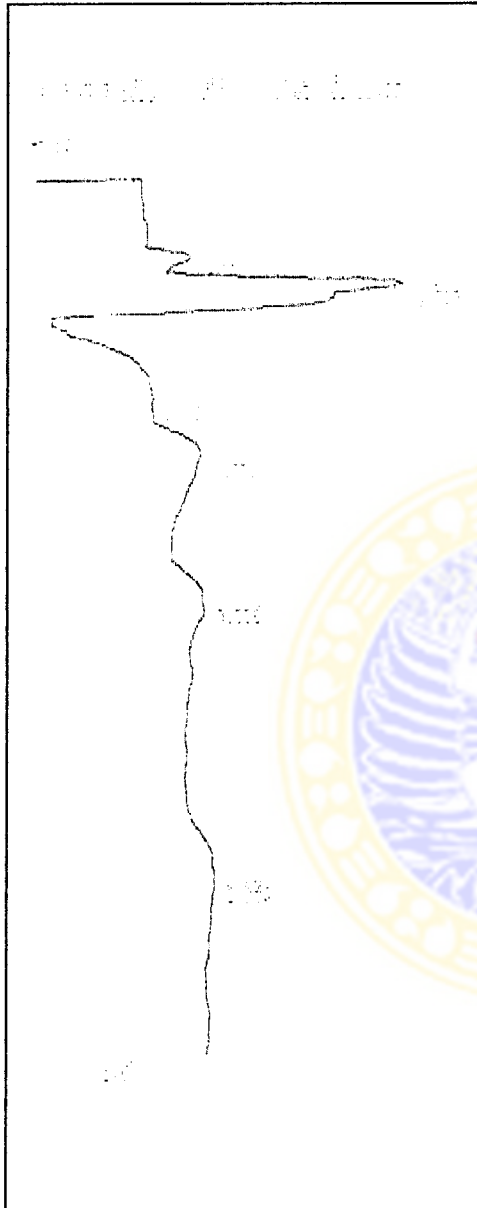
**Kromatogram**

Standar etinil estradiol

Standar optimasi



### Sampel



### Spiking

