

- ETHINYL ESTRADIOL

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

- HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**OPTIMASI KONSENTRASI DETERJEN DAN PELARUT  
ORGANIK PADA ANALISIS ETINIL ESTRADIOL  
MENGUNAKAN *SINGLE DROP MICRO EXTRACTION*  
SECARA HPLC**

**SKRIPSI**

MPL 29 03

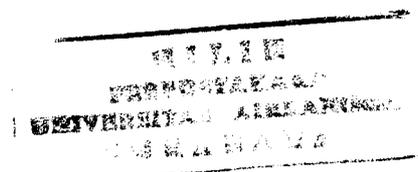
wid

0

**ALFA AKUSTIA WIDATI**



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



**OPTIMASI KONSENTRASI DETERJEN DAN PELARUT  
ORGANIK PADA ANALISIS ETINIL ESTRADIOL  
MENGUNAKAN *SINGLE DROP MICRO EXTRACTION*  
SECARA HPLC**

**SKRIPSI**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sain  
Bidang Kimia Pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Airlangga**



Oleh :

**ALFA AKUSTIA WIDATI  
NIM : 080212498**

**Tanggal Lulus : 10 Juli 2006**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**

**Pembimbing II,**

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

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

**Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si.**

## LEMBAR PENGESAHAN NASKAH SKRIPSI

**Judul** : **Optimasi Konsentrasi Deterjen dan Pelarut Organik Pada Analisis Etinil Estradiol Menggunakan *Single Drop Micro Extraction* Secara HPLC**

**Penyusun** : **Alfa Akustia Widati**

**Nomor Induk** : **080212498**

**Tanggal Ujian** : **10 Juli 2006**

**Disetujui Oleh :**

**Pembimbing I,**

**Pembimbing II,**

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

**Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si.**

**Mengetahui :**

**Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA Universitas Airlangga**



**Dra. Tjitjik Sri Tjahjandarie, Ph.D**

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan, namun tersedia di perpustakaan dalam lingkungan Universitas Airlangga, diperkenankan untuk dipakai sebagai referensi kepustakaan, tetapi pengutipan harus seijin penulis dan harus menyebutkan sumbernya sesuai kebiasaan ilmiah. Dokumen skripsi ini merupakan hak milik Universitas Airlangga.



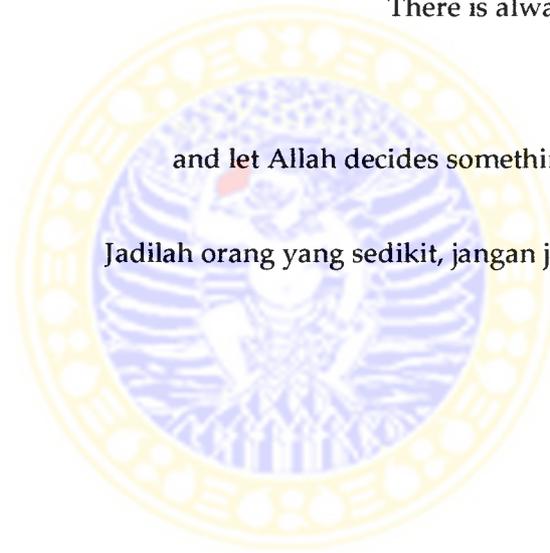
.... niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantaramu dan orang-orang yang di beri ilmu pengetahuan beberapa derajat ....  
(Q.S. Al Mujaadilah 11)

... Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri ....  
(Q.S. Ar Ra'd 11)

There is always a first time moment

Do it your best....  
and let Allah decides something that the best for you

Jadilah orang yang sedikit, jangan jadi orang yang banyak  
(Dra. Hartati, MSi.)



*Skripsi ini kupersembahkan untuk, ..*

*Kedua Orang Tuaku dan Kakakku*

## UCAPAN TERIMA KASIH

1. Alhamdulillah atas rahmat, hidayah, kebesaran, dan kasih sayang Allah SWT
2. Kedua orang tuaku dan kakakku yang telah memberikan doa, dukungan, dan harapan yang besar.
3. Bapak/Ibu dosen Kimia : Pak Ganden, Bu Usreg, Pak Hamami, Bu Cicik, Bu Mira, Bu Tati', Pak Yusuf, Bu Hermin, Bu Aning, Bu Nanik, Bu Alfinda, Pak Ucok, Pak Bambang, Pak Purkan, Pak Sofyan, Bu Afaf, Bu Nyoman, Pak Heri, Bu Sumarsih, Bu Pratiwi, Pak Ali, Pak Budi, Pak Handoko, Pak Abdulloh, Pak Imam, Pak Tokok, Pak Faidur, dan Bu Siti; Terima kasih atas ilmu yang diwariskan, bimbingan, nasehat dan teladan yang diberikan.
4. Proyek DUE LIKE tahun 2005 yang telah membantu dana penelitian ini.
5. Yanuardi, Ratih, Masitah, Nila, dan Haning yang telah menemani, membantu, dan memberikan banyak dukungan. Teman-teman mahasiswa Kimia angkatan 2002 : Vini, Imel, Efi, Eko, Widi Dj, Nia, Rani, Ririn, Elly, Dian, Widi Palupi, Wiwik, Nyoman, Dia, Seno, Amel, Nuri, Hani, Saenah, Usvatun, Roy, Ida, Yunus, Pitra, Alex, Silvi, Ratnil, Santi, Rohma, Anna, Mafula; Terima kasih atas semua bantuan dan persahabatan yang diberikan.
6. Mbak Yuli, Mas Kamto, Mas Yusril, Mbak Muhibah, Mbak Kiki, Pak Gimam, Mas Rochadi, Mas Fendi, Pak Damam, Mbak Ambar, Mbak Andri, Mas Erwin; Terima kasih atas semua bantuannya.
7. Danny "Adjo" Raharjo, Yanto, Anita (Matematika 2002), Mas Agus (Matematika 2001), Yasmin (Fisika 2002), Hela (FKH 2002), Mbak Yus (Kimia 2001), Septi, Nadya, Della, Ira', Sasi, Nuke, Dita (Kimia 2003), Ginarto, Donny, Shindy, Fina, Nisa', Alien (Kimia 2004), Mustafid (Kimia 2005); Terima kasih atas doa, dorongan, dan bantuan yang diberikan.

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi yang berjudul **Optimasi Konsentrasi Deterjen dan Pelarut Organik Pada Analisis Etinil Estradiol Menggunakan *Single Drop Micro Extraction* Secara HPLC** ini dibuat dalam rangka menyelesaikan studi strata satu (S1) untuk memperoleh gelar Sarjana Sain.

Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan atas Nabi Muhammad SAW, pemimpin, panutan, dan pendorong penyusun untuk menyelesaikan skripsi ini. Dalam kesempatan ini, penyusun mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, Dipl. EST, M.Sc. dan Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, bantuan, dan dorongan kepada penyusun.
2. Drs. Hamami, M.Si. selaku dosen wali dan dosen penguji, Dra. Tjitjik Srie Tjahjandarie, Ph.D selaku ketua jurusan Kimia dan dosen penguji, dan Dra. Miratul Khasanah, M.Si. yang banyak memberikan saran dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.
3. Bapak/Ibu dosen kimia yang telah mendidik dan memberikan dukungan pada penyusun.
4. Para pegawai dan karyawan yang banyak memberikan bantuan pada penyusun.

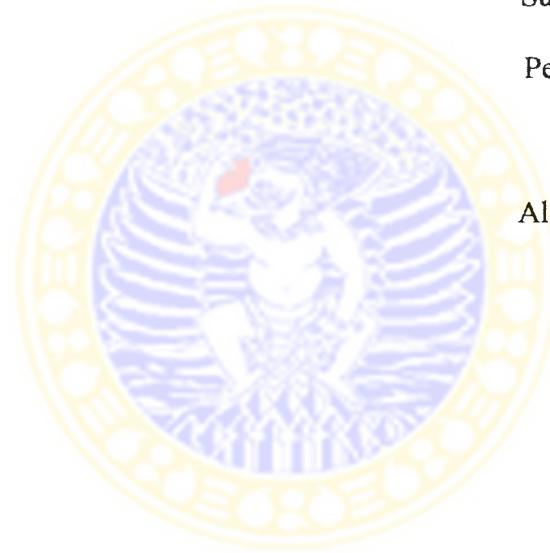
5. Teman-teman mahasiswa kimia umumnya dan angkatan 2002 khususnya yang telah membantu penyelesaian proposal ini.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang turut andil memberikan bantuan.

Penyusun menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Karena itu, penyusun sangat mengharapkan saran dan kritik untuk perbaikan skripsi ini.

Surabaya, Juni 2006

Penyusun

Alfa Akustia Widati



Alfa Akustia Widati, 2006. Optimasi Konsentrasi Deterjen dan Pelarut Organik Pada Analisis Etinil Estradiol Menggunakan *Single Drop Micro Extraction* Secara HPLC. Skripsi di bawah bimbingan Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, Dipl. EST, M.Sc. dan Dra. Usreg Sri Handajani M.Si., Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Airlangga, Surabaya

---

---

### ABSTRAK

Teknologi ekstraksi seperti *Single Drop Micro Extraction* (SDME) telah dikembangkan untuk mengurangi jumlah pelarut, biaya, kemudahan operasional, bentuk praktis, dan hasil yang optimal. Kinerja SDME dipelajari dengan melakukan ekstraksi etinil estradiol dilanjutkan analisis menggunakan HPLC detektor UV dengan kolom *C<sub>18</sub> reverse phase*. Kondisi optimum SDME untuk analisis etinil estradiol diperoleh dengan menggunakan pelarut organik toluen, volume tetes sebesar 5  $\mu$ L, dan konsentrasi NaLS sebagai matriks lingkungan sebesar 0,5 ppm. Dari seri larutan standar etinil estradiol 1 ppm hingga 5 ppm, didapatkan persen *recovery* sebesar 96%-103%. Efisiensi ekstraksi analisis etinil estradiol dengan SDME dipengaruhi matriks air limbah domestik. Melalui teknik spiking dengan konsentrasi etinil estradiol dalam sampel sebesar 1, 3, dan 5 ppm, diperoleh persen *recovery* berkisar antara 64%-73%.

*Kata Kunci : SDME, Etinil Estradiol, Air Limbah Domestik*

Alfa Akustia Widati, 2006. Optimization of Detergent Concentration and Organic Solvent in Analysis of Ethinyl Estradiol Using Single Drop micro Extraction By HPLC. Final project was under guidance Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, Dipl. EST, M.Sc. and Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si., Chemistry Department, Mathematic and Natural Science Faculty, Airlangga University, Surabaya.

---

---

### ABSTRACT

Technology of extraction like Single Drop Micro Extraction (SDME) has been developed to reduce amounts of solvent, cost, easier to operate, simple design, and optimum result. The performance of SDME was studied by doing extraction of ethinyl estradiol and was continued by analyzing using HPLC detector UV combined with C<sub>18</sub> reverse phase column. The optimum condition of SDME in analysis of ethinyl estradiol was obtained by using toluene as organic solvent, volume of organic solvent drop is 5  $\mu$ L, and SDS concentration as a matrix's environment is 5 ppm. From series of ethinyl estradiol standard solution 1 ppm until 5 ppm, was obtained percent recovery varied from 96%-103%. Extraction efficiency of ethinyl estradiol by SDME in sample was influenced by domestic wastewater's matrices. Using spiking technique with concentration of ethinyl estradiol in sample 1, 3, and 5 ppm resulted percent recovery between 64%-73%.

*Keywords : SDME, Ethinyl Estradiol, Domestic Wastewater*

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	ii
<b>ABSTRAK</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	x
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1 <i>Endocrine Disrupting Compounds</i> (EDCs) .....	6
2.1.1 Etinil estradiol .....	7
2.1.1.1 Distribusi dan degradasi etinil estradiol di lingkungan .....	8
2.1.1.2 Toksisitas etinil estradiol .....	9
2.2 Teknik Preparasi Sampel .....	10
2.2.1 Ekstraksi .....	10
2.3 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	14
2.3.1 Instrumentasi HPLC .....	16
2.3.2 Kromatogram HPLC .....	18
2.4 Deterjen .....	19
2.4.1 Natrium Lauril Sulfat (NaLS) .....	21
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	22
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	22
3.2 Sampel, Bahan, dan Alat .....	22
3.2.1 Sampel .....	22
3.2.2 Bahan .....	22
3.2.3 Alat .....	22
3.3 Variabel Penelitian .....	23
3.3.1 Variabel bebas .....	23
3.3.2 Variabel terikat .....	23
3.3.3 Variabel terkontrol .....	23
3.4 Definisi Operasional .....	23
3.5 Prosedur Penelitian .....	24
3.5.1 Diagram alir penelitian .....	24
3.5.2 Pembuatan larutan .....	25
3.5.2.1 Pembuatan larutan induk etinil estradiol 500 ppm ...	25

3.5.2.2 Pembuatan larutan standar etinil estradiol .....	25
3.5.2.3 Pembuatan NaCl 500 ppm .....	25
3.5.2.4 Pembuatan larutan NaLS 500 ppm .....	26
3.5.3 Pembuatan kurva standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME .....	25
3.5.4 Optimasi parameter-parameter analitik .....	26
3.5.4.1 Pengaruh jenis pelarut organik .....	26
3.5.4.2 Pengaruh volume tetes pelarut organik .....	27
3.5.4.3 Pengaruh konsentrasi NaLS .....	27
3.5.5 Pembuatan kurva standar etinil estradiol menggunakan SDME .....	27
3.5.6 Analisis etinil estradiol dalam limbah domestik .....	28
3.5.7 Spiking sampel .....	28
3.6 Analisis Data .....	28
3.6.1 Penentuan presisi .....	28
3.6.2 Penentuan sensitivitas .....	29
3.6.3 Penentuan akurasi .....	30
3.6.4 Penentuan faktor pemekatan .....	30
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>32</b>
4.1 Pembuatan Larutan .....	32
4.2 Pembuatan Kurva Standar Etinil Estradiol Tanpa Menggunakan SDME .....	32
4.3 Optimasi Parameter-Parameter Analitik .....	34
4.3.1 Pengaruh jenis pelarut organik .....	35
4.3.2 Pengaruh volume tetes pelarut organik .....	39
4.3.3 Pengaruh konsentrasi NaLS .....	42
4.3.4 Pembuatan kurva standar etinil estradiol menggunakan SDME .....	43
4.3.5 Penentuan faktor pemekatan dan <i>recovery</i> .....	45
4.4 Analisis Sampel .....	46
4.5 Analisis Spiking Sampel .....	49
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>53</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>54</b>
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

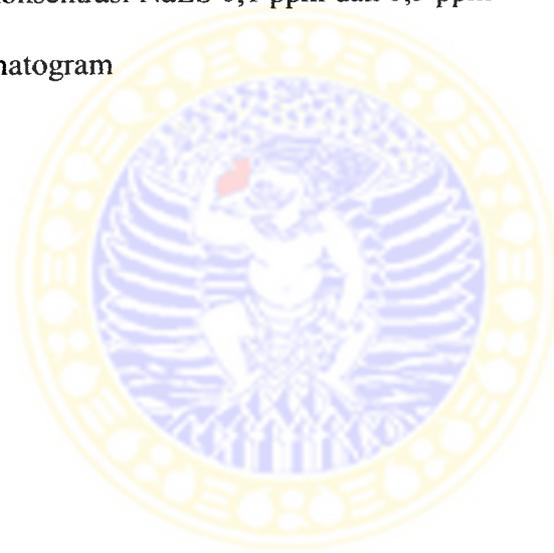
Nomor	Judul Tabel	Halaman
1.1.	Sifat-sifat etinil estradiol .....	7
4.1.	Data pengukuran larutan standar etinil estradiol tanpa SDME .....	33
4.2.	Karakteristik pelarut organik .....	35
4.3.	Data optimasi pelarut organik .....	38
4.4.	Data optimasi volume tetes pelarut organik .....	39
4.5.	Data optimasi konsentrasi NaLS .....	42
4.6.	Data pengukuran larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME ...	44
4.7.	Data persen <i>recovery</i> larutan standar etinil estradiol .....	46
4.8.	Data akseptor KB wilayah Surabaya Timur tahun 2005 .....	47
4.9.	Data analisis sampel .....	48
4.10.	Data spiking sampel I (Lebak Permai) .....	49
4.11.	Data spiking sampel II (Gubeng Jaya) .....	50
4.12.	Data spiking sampel III (Tenggilis Barat) .....	50
4.13.	Kandungan limbah domestik .....	51

## DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul Gambar	Halaman
1	Struktur etinil estradiol .....	7
2.	SDME <i>immersion</i> dan SDME <i>headspace</i> .....	12
3.	Instrumentasi HPLC .....	17
4.	Kromatogram HPLC .....	18
5.	Bentuk skematis surfaktan .....	19
6.	Natrium Lauril Sulfat .....	21
7.	Kurva standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME .....	34
8.	Kurva optimasi pelarut organik .....	38
9.	Kurva optimasi volume tetes pelarut organik .....	39
10.	Gaya-gaya yang bekerja pada tetes pelarut organik .....	41
11.	Kurva optimasi konsentrasi NaLS .....	43
12.	Kurva larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME .....	44
13.	Kurva spiking sampel I (Lebak Permai) .....	49
14.	Kurva spiking sampel II (Gubeng Jaya) .....	50
15.	Kurva spiking sampel III (Tenggilis Barat) .....	51

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Nomor</b>	<b>Judul Lampiran</b>
1	Data pengukuran larutan standar etinil estradiol tanpa dan dengan menggunakan SDME
2	Data optimasi parameter-parameter analitik
3	Data analisis dan spiking sampel
4	Pengolahan data
5	Uji-t antara area volume tetes toluen 5 $\mu\text{L}$ dan 6 $\mu\text{L}$
6	Uji-t antara konsentrasi NaLS 0,1 ppm dan 0,5 ppm
7	Gambar kromatogram



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Permasalahan

Teknik preparasi sampel yang berkembang pesat pada saat ini adalah ekstraksi. Salah satu teknologi ekstraksi yang dikembangkan adalah teknik mikro ekstraksi yang bertujuan untuk mengurangi jumlah pelarut, biaya, kemudahan operasional, bentuk yang praktis dan hasil yang optimal. *Single Drop Micro Extraction* (SDME) merupakan jenis mikro ekstraksi dengan pelarut organik ukuran mikro liter yang dibiarkan menggantung pada ujung syring dan diletakkan dalam larutan sampel baik secara *immersion* (tercelup) maupun *headspace*. SDME dapat digunakan untuk analisis senyawa-senyawa volatil maupun non volatil, dan ekstraktannya dapat secara langsung diinjeksikan ke dalam alat instrumen analisis seperti *Gas Chromatography* (GC) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

Berdasarkan penelitian yang sudah ada, SDME digunakan untuk analisis senyawa nitro aromatik eksplosif dalam air dengan GC-MS (Psillakis dan Kalogerakis, 2001), identifikasi diaikal ftalat ester dalam makanan menggunakan instrumen GC (Battle dan Nerin, 2004), penentuan iodin dalam obat-obat farmasi, garam iodium, susu bubuk dan sayuran menggunakan GC-MS (Das *et al.*, 2004), analisis metil merkuri menggunakan *headspace* SDME dengan menggunakan AAS elektrotermal (Gil *et al.*, 2005), identifikasi senyawa-senyawa tributiltin dalam air dan sedimen diikuti analisis GC (Colombini *et al.*, 2005), penentuan

amina alifatik dalam air menggunakan *headspace* SDME dengan GC (Kaykhali *et al.*, 2005).

Identifikasi senyawa-senyawa di lingkungan merupakan tantangan besar dalam teknik analisis. Kompleksitas matriks dan konsentrasi analit yang rendah memerlukan suatu metode analisis yang sensitif dan selektif. *Endocrine Disrupting Compounds* (EDCs) adalah senyawa-senyawa pengganggu fungsi endokrin yang mendapat perhatian dari peneliti dan pemerhati lingkungan. Etilin estradiol adalah kelompok estrogen sintetik yang termasuk dalam EDCs. Etilin estradiol digunakan dalam pil kontrasepsi, manajemen sindrom menopause dan postmenopause, terapi kanker prostat dan kanker payudara (Kuster *et al.*, 2004). Sebagai contoh akibat akumulasi senyawa ini di lingkungan, burung camar jantan pulau Santa Barbara di California Selatan mengalami feminisasi perilaku seksual (Fry dan Tone, 1981), alligator jantan danau Apopka di Florida mengalami kondisi tidak berkembangnya organ kelamin (Guillette *et al.*, 1994), harimau kumbang jantan Florida ditemukan dengan jumlah sperma rendah (Facemire *et al.*, 1995), dan ikan-ikan di Irlandia Utara mengalami abnormalitas organ reproduksi (Jobling *et al.*, 1996). Pada manusia, senyawa ini menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sperma, meningkatnya frekuensi penyakit kanker payudara, indung telur, testis dan prostat (Giwerzman *et al.*, 1993).

Selama ini, penelitian etilin estradiol menggunakan sampel air karena sebagian besar ekskresi senyawa tersebut berupa cairan dan analisis juga sering dilakukan dalam sedimen karena estrogen lebih mudah terdistribusi dalam lingkungan dan terakumulasi dalam sedimen sungai dan tanah

(Kuster *et al.*, 2004). Berdasarkan penelitian sebelumnya, analisis etinil estradiol dalam sampel air dilakukan menggunakan *Solid Phase Extraction* (SPE) menggunakan instrumen GC/MS/MS dengan *recovery* di atas 70% dan limit deteksi 0,001 µg/L (Ternes *et al.*, 1999), SPE diikuti analisis dengan *Liquid Chromatography* (LC)-*Diode Array detector* (DAD)-*Mass Spectroscopy* (MS) pada sampel air dan sedimen dengan *recovery* yang tinggi (De Alda dan Barcelo, 2001), SPE dan *Pressurized Liquid Extraction* (PLE) menggunakan instrumen LC-*Electrospray Interface* (ESI)-MS detektor UV-Vis dioda array dengan limit deteksi 0,09 µg/L dan 10 µg/kg serta *recovery* sebesar 94% dan 87% untuk sampel air dan sedimen (Cespedes *et al.*, 2004), SPE diikuti analisis LC-ESI-MS mode ionisasi negatif untuk sampel air dengan *recovery* sebesar 91% dan limit deteksi 3,22 ng/L (Mozaz *et al.*, 2004). Selain itu, analisis etinil estradiol juga telah dilakukan dalam sampel bulu sapi menggunakan ekstraksi dialisis *diphasic* dilanjutkan analisis GC-MS dengan *recovery* mencapai 94% (Durant *et al.*, 2002) dan dalam sampel urin dengan SPE dan HPLC detektor fluorescent menggunakan derivatisasi p-nitrobenzoil klorida dengan *recovery* sebesar 99,9% dan limit deteksi 4,6 µg/L (Mao *et al.*, 2004).

Sebagian besar penelitian-penelitian tersebut menggunakan SPE pada tahapan ekstraksi, padahal SPE masih membutuhkan beberapa pelarut organik untuk elusi yang apabila dipandang dari segi biaya masih dianggap tinggi. Hasil yang didapatkan dari penelitian tersebut memang sangat selektif dan sensitif, namun instrumentasi yang digunakan tergolong mahal. Selama ini, belum ada penelitian tentang analisis kadar etinil estradiol dalam lingkungan menggunakan SDME

yang selanjutnya dianalisis dengan HPLC menggunakan detektor UV. Diharapkan metode ini menjadi alternatif penentuan kadar etinil estradiol di lingkungan dengan biaya ekonomis dan hasil yang selektif dan sensitif.

Dalam lingkungan, analisis etinil estradiol menggunakan teknik ekstraksi dipengaruhi oleh keberadaan deterjen. Deterjen sebagai emulgator, dapat mempengaruhi pemindahan etinil estradiol ke dalam fasa organik. Jenis pelarut organik dan volume tetes pelarut organik juga merupakan salah satu faktor yang penting untuk memperoleh efisiensi ekstraksi yang maksimum dalam suatu analisis. Oleh karena itu, penelitian ini akan mempelajari pengaruh konsentrasi deterjen, jenis pelarut organik dan volume tetes pelarut organik terhadap efisiensi ekstraksi, sekaligus mengaplikasikan metode tersebut dalam sampel air limbah domestik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah di atas, muncul permasalahan sebagai berikut :

1. bagaimanakah kondisi optimum deterjen pada penentuan kadar etinil estradiol menggunakan SDME dengan instrumen analisis HPLC ?,
2. bagaimanakah kondisi optimum jenis pelarut organik dan volume tetes pelarut organik pada penentuan kadar etinil estradiol menggunakan SDME dengan instrumen analisis HPLC ?,
3. apakah metode SDME yang telah dioptimasi dapat digunakan untuk analisis etinil estradiol dalam sampel air limbah domestik menggunakan HPLC ?.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan rumusan masalah di atas, maka ditetapkan tujuan penelitian sebagai berikut :

1. mengetahui kondisi optimum deterjen pada penentuan kadar etinil estradiol menggunakan SDME dengan instrumen analisis HPLC,
2. mengetahui kondisi optimum jenis pelarut organik dan volume tetes pelarut organik pada penentuan kadar etinil estradiol menggunakan SDME dengan instrumen analisis HPLC,
3. mengaplikasikan metode SDME yang telah dioptimasi untuk menentukan kadar etinil estradiol dalam sampel air limbah domestik menggunakan HPLC.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat :

1. mengetahui faktor-faktor yang berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi pada penentuan kadar etinil estradiol menggunakan SDME dengan instrumen analisis HPLC sehingga dapat meningkatkan selektifitas dan sensitifitas metode,
2. menghasilkan suatu metode alternatif yang murah, selektif, dan sensitif untuk analisis etinil estradiol di lingkungan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

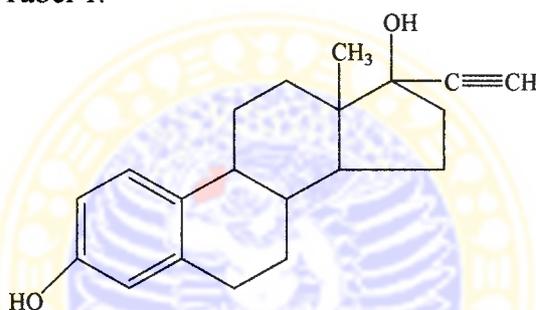
#### 2.1 *Endocrine Disrupting Compounds (EDCs)*

*Endocrine Disrupting Compounds (EDCs)* merupakan kelompok senyawa yang mengganggu fungsi hormon endokrin. Pada konsentrasi yang rendah ( $\pm 1$  ng/L), EDCs menyebabkan penurunan fertilitas, feminisasi dan hermaphroditism pada organisme akuatik (Kuster *et al.*, 2004). Pada manusia, senyawa ini menyebabkan terjadinya penurunan jumlah sperma, meningkatnya frekuensi penyakit kanker payudara, indung telur, testis dan prostat (Giwercman *et al.*, 1993). Senyawa-senyawa yang tergolong EDCs, diantaranya adalah (Cespedes *et al.*, 2004) :

1. **surfaktan non-ionik**, seperti nonilfenol etoksilat, oktilfenol etoksilat, produk degradasi nonilfenol dan oktilfenol;
2. **bisfenol A (BPA)**, monomer polikarbonat, digunakan untuk pengemasan;
3. **ftalat**, digunakan sebagai plastisizer;
4. **hormon sex steroid alami (estradiol, estriol, dan estron) maupun sintetis (mestranol, estradiol valerat, etinil estradiol)**, digunakan untuk pil kontrasepsi, perawatan menstruasi dan menopause;
5. **hormon progesteron alami (dietilstilbestrol), maupun sintetis (noretindron dan levonorgestrel)**, digunakan untuk perawatan infertilitas, kanker payudara dan endometrial;
6. **benzotiazol**, digunakan dalam industri karet.

### 2.1.1 Etilin estradiol.

Etilin estradiol merupakan senyawa yang banyak dimanfaatkan sebagai hormon estrogen sintetis dalam kontrasepsi. Selain itu, senyawa ini juga dimanfaatkan untuk manajemen sindrom menopause dan postmenopause, terapi kanker prostat dan kanker payudara. Di bidang peternakan, etilin estradiol digunakan untuk pemicu pertumbuhan, dan bahan aditif untuk umpan ikan (Kuster *et al.*, 2004). Struktur dan beberapa sifat-sifat etilin estradiol dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 1.



Gambar 1. Struktur etilin estradiol

Tabel 1.1 Sifat-sifat etilin estradiol

Berat molekul	296,41
Kelarutan dalam air	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4,8 mg/L (Lai <i>et al.</i>, 2000); 3,1 mg/L (Kuster <i>et al.</i>, 2004) pada 23°C</li> <li>• 11,3 mg/L pada 27°C (Kuster <i>et al.</i>, 2004)</li> </ul>
Log P <sub>ow</sub> (Koefisien partisi organik-air)	4,1 (Lai <i>et al.</i> , 2000); 3,9 (Jurgens <i>et al.</i> , 2002); 3,67 (Ternes <i>et al.</i> , 2002; Kuster <i>et al.</i> , 2004); 4,15 (Gomes <i>et al.</i> , 2004)

Dalam tubuh, etinil estradiol diserap oleh usus dalam bentuk glukoronida, dan dalam bentuk sulfat di hati dan ginjal, kemudian diekskresikan dalam urin dan feses sebagai glukoronida dan sulfat dalam urin (Mao *et al.*, 2004). Adanya enzim  $\beta$ -Glukoronidase dan Arilsulfatase di lingkungan, dapat mengubah konjugat etinil estradiol menjadi bentuk senyawa induk (etinil estradiol) kembali (Kuster *et al.*, 2004).

#### **2.1.1.1 Distribusi dan degradasi etinil estradiol di lingkungan.**

Etinil estradiol ditemukan di sedimen dan permukaan air (Kuster *et al.*, 2004). Banyak proses yang dapat mengurangi konsentrasi etinil estradiol di perairan seperti fotolisis, biodegradasi dan penyerapan ke sedimen. Selain itu, polaritas yang rendah dan nilai  $P_{ow}$  yang tinggi menyebabkan etinil estradiol lebih mudah terserap ke sedimen.

Sebanyak 13% sampai 92% etinil estradiol terserap ke sedimen dalam waktu 24 jam (Kuster *et al.*, 2004). Penyerapan berlangsung cepat pada 30 menit pertama, dan berangsur-angsur semakin lambat pada menit berikutnya (Lai *et al.*, 2000). Hal ini disebabkan karena difusi terhambat oleh agregat mikropori sedimen. Dalam sedimen, senyawa ini mampu tinggal dalam waktu yang lama. Sedimen dengan *swelling* rendah mampu menyerap etinil estradiol, namun dapat melepaskannya kembali di perairan, dengan koefisien desorpsi 2-3 kali lebih rendah dari proses penyerapan (Jurgens *et al.*, 1999).

Degradasi etinil estradiol adalah proses mikrobial yang kompleks, dikontrol oleh konsentrasi substrat, ketersediaan nutrien, dan keberadaan mikroba yang stabil (Das *et al.*, 2004). Kandungan garam yang tinggi menyebabkan degradasi

mikroba terhambat. Pada musim dingin etinil estradiol mempunyai kemampuan resisten 2 kali lebih besar (Kuster *et al.*, 2004).

#### **2.1.1.2 Toksisitas etinil estradiol.**

Kontaminasi etinil estradiol dalam lingkungan melalui suatu siklus dimana senyawa ini lepas ke perairan dan berujung pada kehidupan organisme akuatik, dan terserap dalam sedimen dan tanah sebagai lahan tumbuhnya tanaman. Siklus ini akan kembali pada kebutuhan hidup manusia dalam pemenuhan makanan dan minuman.

Etinil estradiol mengganggu hormon endokrin dalam tubuh. Oleh karena itu, senyawa ini termasuk dalam kelompok EDCs. Dalam tubuh, EDCs berikatan dengan reseptor estrogen dan mempengaruhi sinyal yang dihasilkan. EDCs mengubah aktivitas hormon seks (androgen dan progesteron), tiroksin, dan glukokortikoid. EDCs tidak hanya menyebabkan munculnya sifat menyerupai hormon tersebut, tetapi juga bertindak sebagai inhibitor (Kelce *et al.*, 1995).

Abnormalitas akibat senyawa EDCs telah terjadi pada hewan. Burung camar jantan pulau Santa Barbara di California Selatan mengalami feminisasi perilaku seksual (Fry dan Tone, 1981), alligator jantan danau Apopka di Florida mengalami kondisi tidak berkembangnya organ kelamin (Guillette *et al.*, 1994), harimau kumbang jantan Florida ditemukan dengan jumlah sperma rendah (Facemire *et al.*, 1995), dan ikan-ikan di Irlandia Utara mengalami abnormalitas organ reproduksi (Jobling *et al.*, 1996). Pada manusia, EDCs mengakibatkan penurunan jumlah sperma, kanker payudara, kanker testis, kanker indung telur, kanker prostat, dan feminisasi pada pria (Giwercman *et al.*, 1993). Dalam jumlah

yang besar, EDCs menyebabkan fetus mempunyai resiko besar mengalami gangguan hormon (Giusti *et al.*, 1995).

## **2.2 Teknik Preparasi Sampel**

Instrumen analisis seperti kromatografi, spektroskopi, dan mikroskopi telah berkembang pesat. Namun, instrumen canggih tersebut tidak mampu menganalisis analit dalam matriks sampel secara langsung, sehingga diperlukan tahapan preparasi sampel. Tahapan preparasi sampel dapat berupa homogenisasi, reduksi ukuran, ekstraksi/pemekatan, dan derivatisasi (Supriyanto, 2005). Preparasi sampel bertujuan untuk memekatkan, memindahkan, dan meningkatkan sinyal analit.

### **2.2.1 Ekstraksi.**

Ekstraksi merupakan teknik preparasi sampel yang banyak dimanfaatkan untuk isolasi dan pemekatan analit dalam sampel. Dasar terjadinya pemisahan analit pada proses ekstraksi adalah perbedaan kelarutan analit dalam dua pelarut yang tidak saling campur. Analit lebih banyak larut dalam zat pengeksrak. Perbandingan antara jumlah analit yang terekstrak dengan jumlah mula-mula disebut efisiensi ekstraksi. Efisiensi ekstraksi ditentukan oleh partisi analit antara matriks sampel dan zat pengeksrak. Partisi dikontrol oleh sifat fisika-kimia analit, matriks sampel dan zat pengeksrak. Apabila komposisi matriks sampel dan zat pengeksrak konstan, maka derajat partisi dan persentase analit yang terekstrak juga konstan, karena partisi tidak bergantung pada konsentrasi analit (Lord dan Pawliszyn, 2000). Semakin besar afinitas analit pada zat pengeksrak, semakin besar pula efisiensi ekstraksinya.

Distribusi analit pada fasa cair dan fasa organik dapat dijelaskan dengan koefisien distribusi (Anderson,1991).

$$K_D = \frac{(A)_o}{(A)_a} \dots\dots\dots (1)$$

dengan ketentuan :

$K_D$  : koefisien distribusi

$(A)_o$  : kelarutan analit pada fasa organik

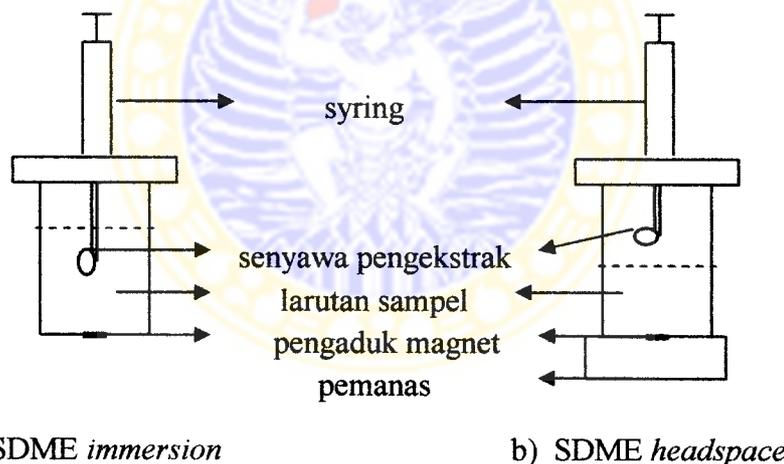
$(A)_a$  : kelarutan analit pada fasa air

Ekstraksi cair-cair merupakan salah satu jenis teknik preparasi sampel yang banyak digunakan dalam analisis. Ekstraksi ini menawarkan reproduibilitas tinggi dan kapasitas volume sampel yang besar, namun ekstraksi cair-cair memerlukan banyak pelarut organik sehingga meningkatkan biaya analisis, toksisitas, menghasilkan limbah yang banyak dan berbahaya, membentuk emulsi dan tidak potensial untuk automasi (Psillakis dan Kalogerakis, 2002). Oleh karena itu, pengembangan teknik ekstraksi ditujukan untuk membuat suatu metode mikro ekstraksi yang menguntungkan dari segi kecepatan ekstraksi, kemampuan mendeteksi analit dengan konsentrasi rendah serta meminimalkan jumlah pelarut organik yang digunakan sehingga mengurangi biaya, limbah yang dihasilkan dan tingkat toksisitas pada proses analisis.

Mikro ekstraksi didefinisikan sebagai teknik ekstraksi dengan volume zat pengekstrak jauh lebih kecil daripada volume sampel (Lord dan Pawliszyn, 2000). Mikro ekstraksi yang telah dikembangkan antara lain ekstraksi tetes mikro (*single drop micro extraction*), ekstraksi membran cair (*liquid membrane extraction*),

mikro ekstraksi hollow fiber (*micro extraction in hollow fibre*), metode kromatomembran (*chromatomembrane method*), ekstraksi fasa padat (*solid phase extraction*), dan mikro ekstraksi fasa padat (*solid phase micro extraction*).

*Single Drop Micro Extraction* (SDME) adalah jenis mikro ekstraksi dimana pelarut organik ukuran mikro liter dibiarkan menggantung pada ujung syring yang diletakkan baik secara *immersion* (tercelup) maupun *headspace* (menggantung di atas sampel) dalam larutan sampel yang diaduk. Setelah ekstraksi selesai, pelarut organik ditarik ke dalam syring dan kemudian diinjeksikan langsung ke instrumen analisis. SDME merupakan teknik ekstraksi yang sederhana, murah, cepat, dan efektif. Bentuk SDME *immersion* dan *headspace* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. SDME *immersion* dan SDME *headspace*

SDME *headspace* biasanya digunakan untuk analisis senyawa-senyawa volatil. Dibanding *immersion*, SDME *headspace* mengalami lebih sedikit kontaminasi oleh matriks lain. Pada SDME, besarnya efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti temperatur, *ionic strength*, pH, jenis pelarut organik, volume tetes pelarut organik, waktu ekstraksi, dan kecepatan

pengadukan, selain itu juga dipengaruhi oleh sifat fisika-kimia analit, matriks sampel dan zat pengekstrak.

Temperatur sangat berpengaruh untuk senyawa jenis volatil. Semakin tinggi temperatur menyebabkan koefisien difusi meningkat, akibatnya waktu ekstraksi semakin singkat (Lord dan Pawliszyn, 2000). Penambahan garam sebagai *ionic strength* dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi karena efek *salting out* (Anderson, 1991). Tetapi kelebihan garam justru dapat menurunkan efisiensi ekstraksi, karena ion-ion garam menghalangi transfer massa analit ke dalam pelarut organik. Kondisi ini tidak berlaku secara umum, artinya setiap senyawa mempunyai karakteristik. Biasanya garam yang ditambahkan pada proses ekstraksi adalah natrium klorida (NaCl).

Pengaruh pH sangat bergantung pada sifat analit. Pada senyawa estrogen, pH asam membuat senyawa konjugat estrogen kembali ke bentuk senyawa induknya (Mao *et al.*, 2004). Pemilihan pelarut organik yang sesuai sangat penting untuk mendapatkan selektifitas senyawa target. Pelarut organik yang digunakan dipilih berdasarkan selektifitas, efisiensi ekstraksi, serta kestabilan tetes pelarut organik karena pengadukan dan lama ekstraksi.

Penggunaan volume tetes pelarut organik yang semakin besar, seharusnya akan semakin meningkatkan jumlah analit yang terekstrak. Akan tetapi, semakin besar tetes pelarut organik menyebabkan tetes pelarut organik tersebut kurang stabil terhadap pengadukan sehingga dapat lepas dari ujung syring. Waktu ekstraksi mempengaruhi jumlah analit yang terekstrak dari sampel menuju zat pengekstrak. Kecepatan pengadukan selain berguna untuk menghomogenkan

larutan, juga berguna untuk memacu transfer massa yang terjadi antara analit dan zat pengekstrak (Psillakis dan Kalogerakis, 2002).

Faktor-faktor tersebut mempunyai pengaruh besar terhadap efisiensi ekstraksi. Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu optimasi parameter-parameter tersebut untuk menentukan kondisi optimum ekstraksi.

### **2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan *liquid chromatography* modern yang efisiensinya sama dengan *gas liquid chromatography*. HPLC mirip dengan kromatografi kolom konvensional. Perbedaan terletak pada ukuran kolom HPLC yang lebih kecil daripada kromatografi kolom konvensional, sehingga waktu retensinya singkat dan analisis berlangsung cepat. HPLC mempunyai ketepatan dan ketelitian tinggi, pelarut dan kolom dapat dipakai berulang kali (Mulja dan Suharman, 1995). Dibanding GC, HPLC tidak dipengaruhi oleh volatilitas dan stabilitas bahan terhadap suhu.

Dasar pemisahan HPLC adalah perbedaan kecepatan migrasi dari komponen-komponen dalam sampel yang terjadi karena adanya perbedaan keseimbangan distribusi dalam fasa diam dan fasa gerak. Terdapat beberapa mekanisme pemisahan dalam sistem kromatografi, yaitu:

1. mekanisme adsorpsi

Fasa diam yang digunakan adalah zat padat aktif atau adsorben yang umumnya bersifat polar (seperti silika gel atau alumina), dan bersifat non polar (seperti karbon grafit). Adsorben yang bersifat polar akan mempunyai afinitas

kecil untuk mengadsorpsi fasa gerak yang bersifat non polar, dan sebaliknya. Adsorpsi terbentuk melalui ikatan hidrogen dan interaksi dipol-dipol. Komponen yang kuat diadsorpsi berjalan lebih lambat dari komponen yang kurang diadsorpsi, sehingga terjadi pemisahan.

## 2. mekanisme partisi

Fasa diam adalah cairan yang terikat pada padatan atau gugus organik yang terikat pada padatan. Zat padat bertindak sebagai pendukung fasa diam. Fasa diam yang terikat pada gugus tertentu banyak digunakan dalam kromatografi. Fasa diam ini dibuat dengan mereaksikan organoklorosilan dengan gugus hidroksil yang reaktif dalam silika. Umumnya, gugus fungsi senyawa organiknya mengandung rantai lurus oktil (C-8) atau oktildesil (C-18).

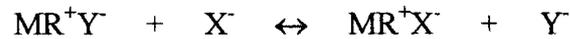
Fasa diam yang terikat pada zat padat dialiri oleh fasa gerak yang membawa komponen. Komponen akan terdistribusi pada kedua fasa, komponen yang lebih larut pada fasa diam akan terelusi lebih lama.

Berdasar kepolaran fasanya, kromatografi partisi dibedakan menjadi dua macam yaitu kromatografi fasa normal dan kromatografi fasa sungsang (*reverse phase chromatography*). Kromatografi fasa normal yaitu kromatografi partisi dengan fasa diam bersifat polar, dan fasa gerak bersifat non polar, sedangkan kromatografi fasa sungsang menggunakan fasa diam bersifat non polar dan fasa gerak bersifat polar.

## 3. mekanisme pertukaran ion

Pertukaran ion melibatkan substitusi spesi ionik. Fasa diam berupa matriks (M) yang membawa muatan negatif atau positif ( $R^-$  atau  $R^+$ ) yang memberikan

ruang penukar ion. *Counter ion* yang bermuatan berlawanan dengan muatan matriks ( $Y^-$  atau  $Y^+$ ) terasosiasi dalam *site* matriks dan dapat bertukar dengan ion bermuatan sama dari sampel ( $X^-$  atau  $X^+$ ) dalam fasa gerak.



Atau



#### 4. mekanisme eksklusi

Mekanisme eksklusi didasarkan ukuran pori gel. Molekul yang berukuran kecil akan terperangkap pada pori fasa diam sehingga terelusi lebih lama. Molekul berukuran besar terelusi lebih cepat, sedangkan molekul berukuran sedang akan terperangkap pada sebagian pori yang sesuai dan waktu elusi yang dibutuhkan lebih lama dari molekul besar dan lebih cepat dari molekul kecil.

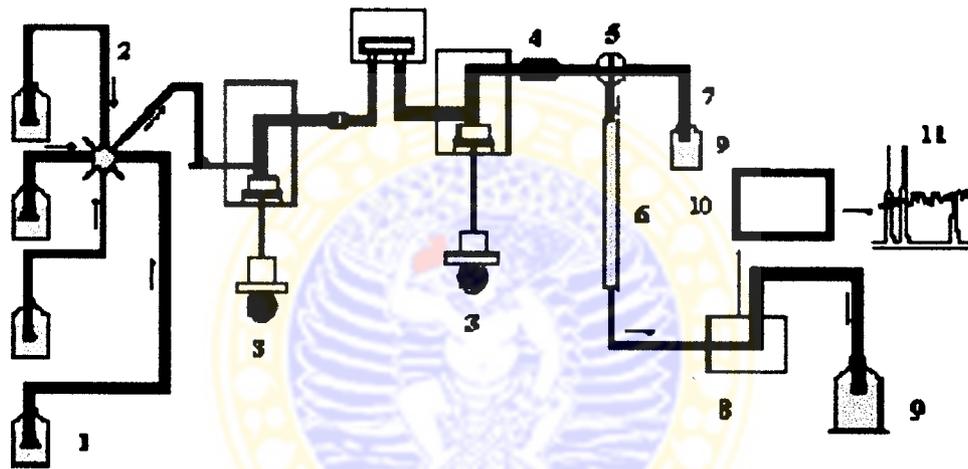
#### 5. interaksi kiral

Pemisahan kiral didasarkan pada perbedaan interaksi stereokimia antara komponen-komponen enansiomer dalam campuran sampel. Permukaan fasa diam biasanya sudah diimobilisasi dengan salah satu bentuk enansiomer.

### 2.3.1 Instrumentasi HPLC.

Secara garis besar, instrumentasi HPLC terdiri dari injektor, pompa, kolom, dan detektor. Sampel dalam syring yang siap dianalisis diinjeksikan ke dalam HPLC melalui *injection port*. Selanjutnya, sampel dibawa ke dalam kolom oleh fasa gerak untuk dipisahkan menjadi komponen-komponennya. Pompa digunakan untuk mensuplai fasa gerak. Terdapat 2 macam pompa dalam HPLC, yaitu pompa pencampur yang digunakan untuk mengangkut eluen dari tangki, dan pompa

analisis. Komponen-komponen yang telah dipisahkan dalam kolom, selanjutnya dibaca oleh detektor dengan cara memonitor fasa gerak yang keluar dari kolom. Detektor yang biasa digunakan dalam HPLC adalah detektor *Ultra Violet* (UV), *Infra Red* (IR), *Refractive Index* (RI), *Mass Spectroscopy* (MS), dan fluoresensi. Sinyal analit digambarkan dalam bentuk kromatogram. Bentuk instrumentasi HPLC ditunjukkan pada Gambar 3.



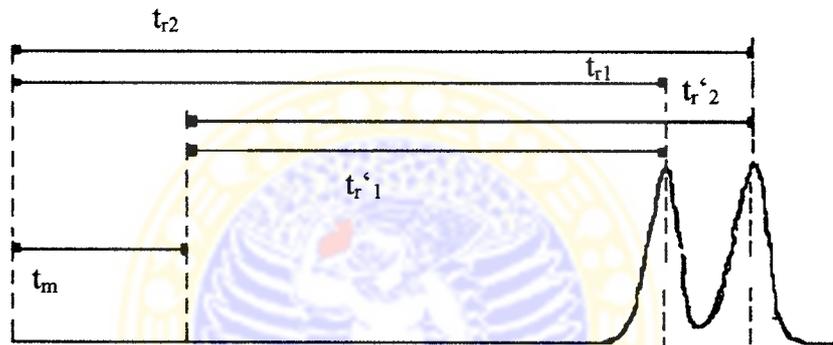
Gambar 3. Instrumentasi HPLC (Mulja dan Suharman, 1995)

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      |
| 5. Gerbang suntik       | 11. Kromatogram     |

### 2.3.2 Kromatogram HPLC.

Kromatogram HPLC merupakan hubungan antara respon detektor sebagai ordinat dan waktu sebagai absis pada sistem koordinat. Kromatogram yang ideal berupa garis tegak lurus. Akan tetapi, keadaan ini tidak akan dijumpai pada HPLC karena molekul-molekul analit tidak secara serempak keluar dari kolom. Oleh karena itu, profil kromatogram HPLC berbentuk melebar. Bentuk kromatogram dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Kromatogram HPLC (Mulja dan Suharman, 1995)

Keterangan :

- $t_r$  : waktu retensi yaitu waktu yang diperlukan oleh komponen mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor.
- $t_m$  : waktu mati yaitu waktu yang diperlukan oleh fasa gerak mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor.
- $t_r'$  : waktu retensi terkoreksi yaitu selisih antara waktu retensi dengan waktu mati.

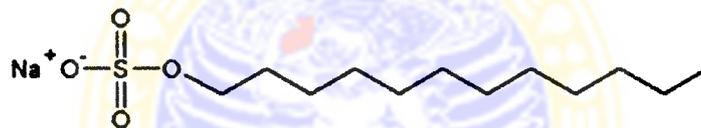
Molekul surfaktan yang membentuk kelompok disebut misel. Misel adalah agregat berukuran koloid yang terjadi akibat asosiasi molekul surfaktan. Konsentrasi saat mulai terbentuknya misel disebut *Critical Micelle Concentration* (CMC).

Berdasarkan asalnya, surfaktan dibedakan menjadi surfaktan alami dan surfaktan sintetis. Surfaktan alami seperti lesitin, kolesterol, gum, linolin, alginat, dan turunan selulosa. Surfaktan sintetis dibedakan lagi berdasar muatannya yaitu surfaktan kationik, surfaktan anionik, surfaktan non ionik, dan surfaktan amfoterik.

Surfaktan kationik adalah surfaktan yang mengandung gugus kation pada bagian yang larut dalam air. Terdapat 2 golongan surfaktan kationik, yaitu amina primer, sekunder, dan tersier, yang rantai panjangnya larut dalam asam, dan senyawa amina kuartener yang rantai panjangnya larut dalam semua kondisi pH. Surfaktan anionik adalah surfaktan yang mengandung gugus anion pada bagian yang larut dalam air. Surfaktan anionik yang banyak digunakan adalah senyawa alkil sulfat dan alkil benzena sulfonat, misalnya natrium lauril sulfat. Surfaktan jenis ini paling banyak dijumpai di pasaran. Surfaktan non ionik adalah surfaktan yang tidak mempunyai gugus yang dapat terionisasi dan tidak bermuatan, tetapi mempunyai ikatan hidrogen yang efektif pada ujung rantai alkil sehingga dapat larut dalam air. Surfaktan amfoterik adalah surfaktan yang memiliki gugus anionik dan gugus kationik. Surfaktan amfoterik bergantung pada pH larutan untuk terurai menjadi bermuatan negatif atau positif.

### 2.4.1 Natrium Lauril Sulfat (NaLS).

Natrium Lauril Sulfat (NaLS) atau *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) merupakan salah satu jenis surfaktan anionik yang digunakan dalam pembuatan pasta gigi, shampo, dan deterjen. NaLS mempunyai rumus molekul  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$  dengan berat molekul 288,38; titik lebur  $206^\circ\text{C}$ , CMC dalam air murni adalah 0,0085 M dengan jumlah agregat sekitar 50, berbentuk kristal berwarna putih susu, dan sedikit berbau lemak, kelarutan 1g/10 mL air (Anonim, 2001). Dalam laboratorium, NaLS digunakan untuk elektroforesis gel poliakrilamida (SDS-PAGE). Struktur NaLS dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Natrium Lauril Sulfat (NaLS)

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Airlangga, mulai Desember 2005 sampai Juni 2006.

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

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

Sampel diambil dari air limbah domestik yang diperoleh di kawasan Surabaya Timur. Sampel diambil di 3 tempat yaitu daerah Lebak Permai (kecamatan Tambaksari), Gubeng Jaya (kecamatan Gubeng), dan Tenggilis Barat (kecamatan Tenggilis Mejoyo).

##### **3.2.2 Bahan.**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai derajat kemurnian pro analisis (p.a) yaitu etinil estradiol, kloroform, toluen, karbon tetraklorida, natrium klorida, natrium lauril sulfat, metanol dan asetonitril. Air yang digunakan adalah akuabides.

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

Penelitian ini menggunakan seperangkat alat HPLC Hewlett Packard 1050 detektor UV, kolom  $C_{18}$  *reverse phase* seri 79925 ODE/564 Lichrosper 100RP-18e  $5 \mu\text{m}$  125-4, syring Hamilton Gastight 1700 *series syringe* 25  $\mu\text{L}$ , integrator

Hewlett Packard 3996 *series 2*, *vacuum degasser*, mikro pipet Eppendorf dan tip, kertas saring Schleicher Schuell Ø 90 mm, kertas saring Whatman *cellulose nitrate membrane filter* diameter pori 0,45 µm, stirer, pengaduk stirer, Buchner, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel bebas.

Variabel bebas adalah variabel yang besarnya diubah-ubah. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis pelarut organik, volume tetes pelarut organik, dan konsentrasi natrium lauril sulfat (NaLS).

#### 3.3.2 Variabel terikat.

Variabel terikat adalah variabel yang nilainya tergantung dari besarnya variabel bebas. Adapun variabel terikatnya adalah area kromatogram.

#### 3.3.3 Variabel terkontrol.

Variabel terkontrol adalah variabel yang nilainya diupayakan tetap. Dalam penelitian ini, variabel terkontrol terdiri dari besarnya panjang gelombang, waktu pengadukan, kecepatan pengadukan, dan konsentrasi garam.

### 3.4 Definisi Operasional

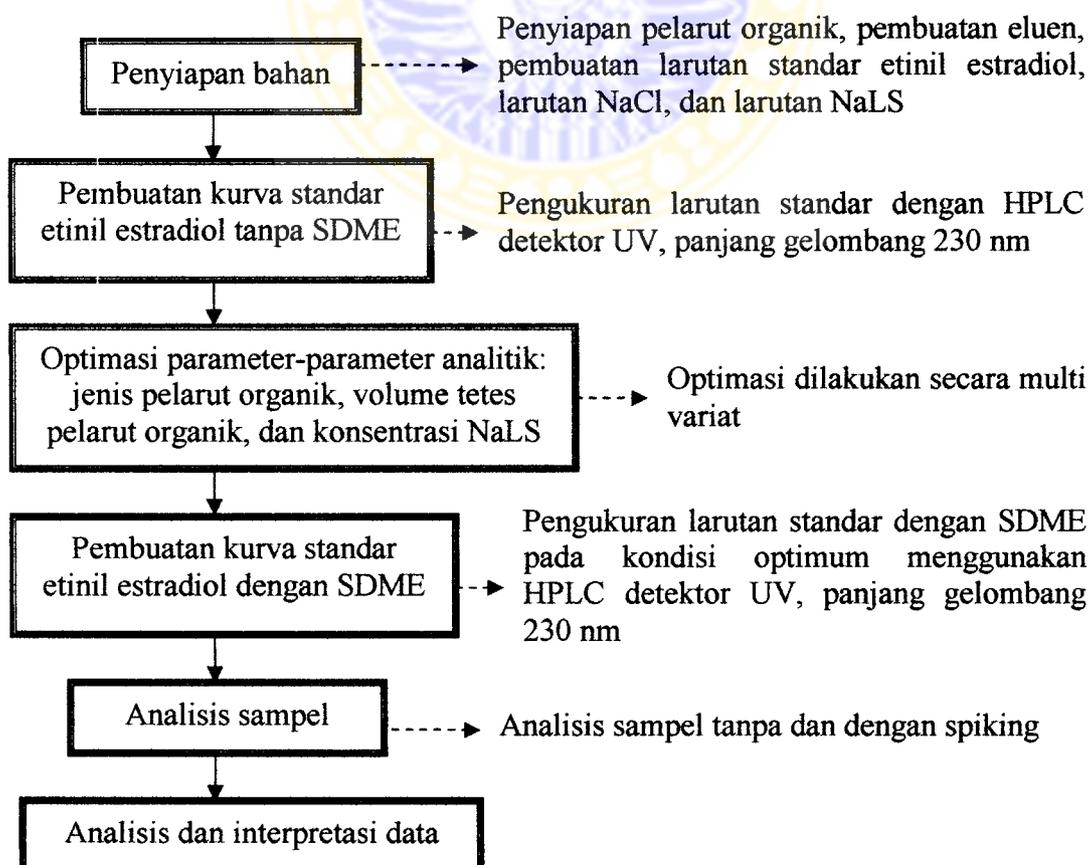
Jenis pelarut organik : variasi pelarut organik menggunakan toluen, kloroform dan karbon tetraklorida.

Volume tetes pelarut organik : variasi volume tetes pelarut organik sebesar 1, 2, 3, 4, 5, 6 dan 7 µL.

Konsentrasi NaLS	: variasi konsentrasi NaLS sebesar 0,1; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 ppm.
Area kromatogram	: besarnya luasan gambar dari sinyal detektor yang mewakili konsentrasi sampel.
Panjang gelombang	: panjang gelombang analisis adalah 230 nm.
Waktu pengadukan	: pengadukan sampel dilakukan selama 12 menit.
Kecepatan pengadukan	: pengadukan dengan kecepatan 1200 rpm.
Konsentrasi garam	: NaCl ditambahkan sehingga konsentrasi dalam larutan sebesar 5 ppm.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Diagram alir penelitian.



### **3.5.2 Pembuatan larutan.**

#### **3.5.2.1 Pembuatan eluen.**

Dibuat campuran asetonitril, metanol, dan air dengan perbandingan 3,5 : 1,5 : 4,5 (Supriyanto, 2005). Campuran dihomogenkan, dan disaring dengan corong Buchner.

#### **3.5.2.2 Pembuatan larutan induk etinil estradiol 500 ppm.**

Ditimbang dengan teliti 125 mg etinil estradiol dan selanjutnya dilarutkan dalam metanol. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan menggunakan metanol hingga tanda batas.

#### **3.5.2.3 Pembuatan larutan standar etinil estradiol.**

Larutan standar etinil estradiol adalah larutan etinil estradiol dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dalam 1% metanol, yang mengandung NaCl sebesar 5 ppm dan NaLS sebesar 0,5 ppm. Penambahan NaCl dan NaLS berguna sebagai matriks lingkungan. Di lingkungan kadar NaCl sebesar 5 ppm (Tang dan Lee, 2002) dan kadar NaLS sebagai deterjen sebesar 0,5 ppm (Nugroho, 2001). Pembuatan larutan standar diperoleh dari pengenceran larutan induk.

#### **3.5.2.4 Pembuatan larutan NaCl 500 ppm.**

Ditimbang dengan teliti 125 mg NaCl dan selanjutnya dilarutkan dalam air. Larutan dipindahkan ke dalam labu ukur 250 mL dan diencerkan menggunakan air hingga tanda batas.

### **3.5.2.5 Pembuatan larutan NaLS 500 ppm.**

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

### **3.5.3 Pembuatan kurva standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME.**

Masing-masing sebanyak 25  $\mu$ L larutan standar etinil estradiol yang terdiri dari campuran larutan etinil estradiol, NaCl, dan NaLS diukur secara langsung menggunakan HPLC detektor UV dengan panjang gelombang 230 nm. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva standar etinil estradiol tanpa SDME antara konsentrasi larutan standar dan area.

### **3.5.4 Optimasi parameter-parameter analitik.**

#### **3.5.4.1 Pengaruh jenis pelarut organik.**

Optimasi pelarut organik dilakukan dengan menggunakan toluen, kloroform, dan karbon tetraklorida. Masing-masing sebanyak 20,00 mL campuran larutan standar etinil estradiol diletakkan dalam gelas piala berukuran 30 mL. Syring yang berisi 20  $\mu$ L toluen dimasukkan ke dalam larutan standar. Sebanyak 3  $\mu$ L toluen dikeluarkan menggantung dari syring dalam larutan standar. Larutan diaduk dengan kecepatan 1200 rpm selama 12 menit. Setelah ekstraksi selesai, toluen ditarik dan diuapkan dalam vial kemudian dilarutkan kembali (*reconstitute*) menggunakan metanol dan diinjeksikan kedalam HPLC. Prosedur yang sama dilakukan untuk pelarut organik kloroform dan karbon tetraklorida. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat grafik antara jenis pelarut organik dan area.

#### **3.5.4.2 Pengaruh volume tetes pelarut organik.**

Optimasi volume tetes pelarut organik diperoleh dengan melakukan variasi volume tetes pelarut organik antara 1  $\mu\text{L}$  hingga 7  $\mu\text{L}$ . Pelarut organik yang digunakan adalah pelarut organik yang memberikan efisiensi ekstraksi optimum. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara yang sama seperti prosedur 3.5.4.1. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat grafik antara volume tetes pelarut organik dan area.

#### **3.5.4.3 Pengaruh konsentrasi NaLS.**

Optimasi konsentrasi NaLS diperoleh dengan melakukan variasi konsentrasi NaLS dalam larutan, yaitu 0,1; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 ppm. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara yang sama seperti prosedur 3.5.4.1 dengan menggunakan jenis pelarut organik dan volume tetes pelarut organik hasil optimasi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat grafik antara konsentrasi NaLS dan area.

#### **3.5.5 Pembuatan kurva standar etinil estradiol menggunakan SDME.**

Sebanyak 20,00 mL seri larutan standar etinil estradiol yang terdiri dari campuran larutan etinil estradiol, NaCl, dan NaLS, diekstraksi seperti prosedur 3.5.4.1 dengan menggunakan jenis pelarut organik, volume tetes pelarut organik, dan konsentrasi NaLS hasil optimasi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva antara konsentrasi larutan standar dan area.

### **3.5.6 Analisis etinil estradiol dalam limbah domestik.**

Sampel disimpan pada suhu dingin, dan disimpan maksimum 7 hari (Mozaz, *et al.*, 2004). Sebelum dianalisis, sampel disaring sebanyak 2 kali dengan menggunakan kertas saring diameter 90 mm dan kertas saring dengan diameter pori 0,45  $\mu\text{m}$ .

Sebanyak 20,00 mL sampel diekstraksi seperti prosedur 3.5.4.1 dengan menggunakan jenis pelarut organik, volume tetes pelarut organik, dan konsentrasi NaLS hasil optimasi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Kadar etinil estradiol diperoleh dari persamaan kalibrasi kurva standar etinil estradiol dengan SDME.

### **3.5.7 Spiking sampel.**

Spiking sampel dilakukan dengan menggunakan 3 konsentrasi yaitu 1, 3, dan 5 ppm. Sampel yang mengandung etinil estradiol sebanyak 1 ppm diekstraksi seperti prosedur 3.5.4.1 dengan menggunakan jenis pelarut organik, volume tetes pelarut organik, dan konsentrasi NaLS hasil optimasi. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Prosedur yang sama dilakukan untuk spiking konsentrasi 3 ppm dan 5 ppm.

## **3.6 Analisis Data**

### **3.6.1 Penentuan presisi.**

Presisi adalah besarnya kesesuaian dari suatu nilai hasil pengukuran yang dilakukan berulang-ulang pada sampel yang sama. Presisi menyatakan derajat kedapatulangan (*reproducibility*). Nilai presisi dinyatakan dengan persen

koefisien variasi (%KV). Semakin kecil %KV, semakin baik presisi yang diberikan pada pengukuran tersebut.

$$\%KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \dots\dots\dots (2)$$

dengan ketentuan :

%KV : persen koefisien variasi

SD : standar deviasi;  $SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

$\bar{x}$  : nilai rata-rata pengukuran;  $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

x : nilai setiap pengukuran

n : jumlah pengukuran

### 3.6.2 Penentuan sensitivitas.

Sensitivitas adalah ukuran kemampuan metode/instrumen untuk memberikan respon terhadap adanya analit dalam sampel. Nilai sensitivitas dinyatakan dengan limit deteksi (LOD). Limit deteksi adalah konsentrasi terkecil yang masih dapat terdeteksi oleh metode/instrumen. Semakin rendah LOD, semakin sensitif metode/instrumen tersebut.

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

dengan ketentuan :

$Y_{LOD}$  : sinyal konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi

$Y_{bl}$  : intersep kurva kalibrasi

$S_{bl} : = S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y - \hat{y})^2}{n - 2}}$

y : sinyal analisis

$\hat{y}$  : nilai hasil substitusi x ke dalam persamaan kurva kalibrasi

n : jumlah pengukuran

Harga  $Y_{LOD}$  yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan kurva kalibrasi sehingga diperoleh nilai  $x$ . Nilai  $x$  menyatakan LOD metode/instrumen.

### 3.6.3 Penentuan akurasi.

Akurasi adalah ketepatan nilai hasil pengukuran. Akurasi dinyatakan dengan persen *recovery* (%R). %R dikatakan bagus apabila nilainya 90%-110% (Hayun *et al.*, 2004)

$$\%R = \frac{C_e}{C_s} \times 100 \% \quad \dots\dots\dots (4)$$

dengan ketentuan :

%R : persen *recovery*

$C_e$  : pengukuran konsentrasi setelah ekstraksi

$C_s$  : konsentrasi sebenarnya

### 3.6.4 Penentuan faktor pemekatan.

Faktor pemekatan menyatakan besarnya pemekatan konsentrasi analit dari larutan yang diekstrak ke dalam zat pengestrak pada proses ekstraksi. Terdapat 2 macam faktor pemekatan yaitu faktor pemekatan teoritis dan faktor pemekatan sebenarnya (Supriyanto, 2005).

$$EF_{th} = \frac{V_s}{V_e} \quad \dots\dots\dots (5)$$

$$EF_{tr} = EF_{th} \times R \quad \dots\dots\dots (6)$$

dengan ketentuan :

$EF_{th}$  : faktor pemekatan teoritis

$EF_{tr}$  : faktor pemekatan sebenarnya

$V_s$  : volume sampel

$V_e$  : volume akhir setelah ekstraksi

$R$  : *recovery* rata-rata



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Pembuatan Larutan

Pembuatan larutan meliputi pembuatan eluen HPLC dan larutan standar etinil estradiol. Eluen dibuat dari campuran asetonitril, metanol, dan air dengan perbandingan 3,5 : 1,5 : 4,5. Pemilihan komponen eluen dan perbandingannya diperoleh dari penelitian Supriyanto (2005) yang menyatakan bahwa dari campuran asetonitril, metanol, dan air dengan perbandingan 3,5 : 1,5 : 4,5 sebagai eluen HPLC untuk analisis etinil estradiol dapat diperoleh waktu stabilisasi yang lebih singkat dan waktu resolusi yang lebih besar dibanding menggunakan metanol; metanol : air (80 : 20) yang mengandung 0,5% (v/v) asam format dalam air; dan metanol : air (81 : 19) yang mengandung 0,5% (v/v) asam format dalam air.

Pembuatan larutan standar etinil estradiol adalah pembuatan campuran larutan etinil estradiol, NaCl dan NaLS sebagai matriks lingkungan. Besarnya konsentrasi NaCl dan NaLS sebagai deterjen dalam larutan dibuat sama seperti dalam lingkungan yakni sebesar 5 ppm (Tang dan Lee, 2002) untuk NaCl dan 0,5 ppm untuk deterjen (Nugroho,2001).

#### 4.2 Pembuatan Kurva Standar Etinil Estradiol Tanpa Menggunakan SDME

Kurva standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME diperoleh dengan mengukur secara langsung seri larutan standar etinil estradiol 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm

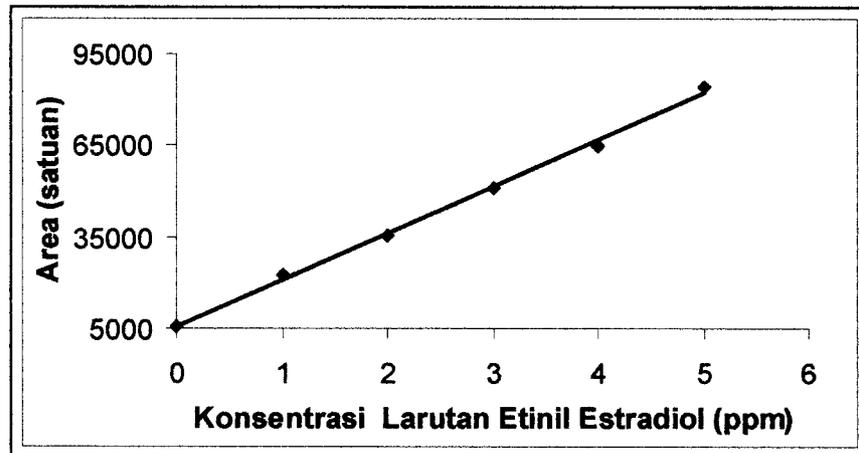
dengan HPLC pada panjang gelombang 230 nm. Pembuatan kurva standar ini bertujuan untuk mengetahui besarnya pemekatan yang terjadi pada proses ekstraksi dengan SDME, membandingkan limit deteksi antara pengukuran larutan etinil estradiol tanpa dan dengan menggunakan SDME, dan untuk mengetahui linearitas dan reproduibilitas alat.

Suatu kurva kalibrasi dinyatakan mempunyai linearitas yang tinggi apabila nilai koefisien korelasinya ( $r^2$ ) lebih besar daripada 0,99 (Brauen *et al.*, 2003). Sedangkan reproduibilitas dapat dilihat dari nilai koefisien variasi (KV), reproduibilitas baik apabila harga %KV kecil.

Pengukuran larutan dengan menggunakan HPLC terbaca dalam bentuk kromatogram dan terukur dalam bentuk area. Data area hasil pengukuran seri larutan standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan kurva standar yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 7.

Tabel 4.1 Data pengukuran larutan standar etinil estradiol tanpa SDME

<b>Konsentrasi (ppm)</b>	<b>Area Rata-Rata (satuan)</b>	<b>KV (%)</b>
1	22.307,33	0,59
2	35.162,33	0,66
3	50.943,67	1,52
4	64.345	0,63
5	84.249,33	3,32



Gambar 7. Kurva standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME

Dari kurva standar diperoleh persamaan kalibrasi  $y = 15307 x + 5481,5$  dengan nilai  $r^2$  sebesar 0.9966. Oleh karena nilai  $r^2$  lebih besar dari 0,99, maka dapat dikatakan bahwa terdapat hubungan linier antara konsentrasi etinil estradiol dengan sinyal detektor. Nilai %KV yang berkisar antara 0,59%-3,32% menunjukkan bahwa reproduktibilitas instrumen HPLC yang digunakan adalah baik. Dari data area yang diperoleh, didapatkan limit deteksi pengukuran larutan standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME adalah sebesar 0,42 ppm.

#### 4.3 Optimasi Parameter-Parameter Analitik

Beberapa parameter analitik perlu dipelajari untuk memperoleh kinerja SDME yang optimum. Penelitian ini mempelajari pengaruh jenis pelarut organik, volume tetes pelarut organik, dan konsentrasi deterjen sebagai matriks yang terdapat dalam sampel air limbah domestik terhadap efisiensi ekstraksi dengan menggunakan SDME.

### 4.3.1 Pengaruh jenis pelarut organik.

Dalam ekstraksi, pemilihan pelarut organik merupakan tahapan penting untuk memperoleh selektivitas tinggi terhadap senyawa target. Pada uji pendahuluan telah dilakukan percobaan terhadap pelarut organik golongan alkohol (butanol), alkana (heksana), alkana tersubstitusi (kloroform dan karbon tetraklorida), dan benzena tersubstitusi (toluen). Selektivitas dan kestabilan tetes pelarut organik merupakan syarat utama yang harus dipenuhi pelarut organik pada SDME.

Pemilihan pelarut organik dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya titik didih, densitas,  $\log P_{ow}$ , tegangan permukaan, dan konstanta dielektrik. Data karakteristik butanol, heksana, kloroform, karbon tetraklorida, dan toluen dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Karakteristik pelarut organik

Sifat Fisik	Pelarut Organik				
	Butanol	Heksana	Kloroform	Karbon tetraklorida	Toluen
Titik didih (°C)	117,7	68,7	62	76,72	110,6
Densitas pada 20°C (g/cm <sup>3</sup> )	0,81	0,65	1,48	1,59	0,87
Konstanta Dielektrik	17,5	1,88	4,8	2,2	2,38
Log $P_{ow}$ (25°C)	0,9	3,09	1,98	2,64	2,73
Tegangan permukaan pada 25°C (N/m)	0,0243	0,0179	0,0271	0,0270	0,0284

Sumber : [www.trimen.pl/witek/clecze./old-liquids.html](http://www.trimen.pl/witek/clecze./old-liquids.html) ; 20 Juni 2006

Titik didih berhubungan dengan waktu yang dibutuhkan untuk penguapan (*dryness*) pelarut organik sebelum dilarutkan kembali (*reconstitute*). Titik didih yang rendah menjadi syarat pelarut organik pada analisis menggunakan HPLC *Reverse Phase* karena adanya senyawa non polar akan menimbulkan masalah dalam kolom HPLC. Log  $P_{ow}$  dan konstanta dielektrik berhubungan dengan selektivitas pelarut organik. Besarnya koefisien partisi dinyatakan dengan nilai log  $P_{ow}$ . Semakin besar nilai log  $P_{ow}$ , maka semakin besar sifat kenonpolarannya. Semakin besar konstanta dielektrik suatu pelarut organik menyebabkan semakin kecil interaksi Coulomb yang terjadi di dalam larutan sehingga pelarut organik tersebut cenderung melarutkan senyawa dalam bentuk ion (zarah bebas). Butanol memiliki konstanta dielektrik yang tinggi dan log  $P_{ow}$  yang rendah daripada pelarut organik lain sehingga butanol kurang sesuai digunakan sebagai pelarut organik senyawa non polar termasuk etinil estradiol.

Densitas dan tegangan permukaan berhubungan dengan kestabilan tetes pelarut organik. Semakin tinggi nilai tegangan permukaan menyebabkan tetes pelarut organik dalam larutan akan semakin stabil. Densitas yang rendah menyebabkan pelarut organik cenderung mengapung di permukaan air apabila digunakan untuk analisis sampel yang memiliki berat jenis besar.

Heksana memiliki selektivitas yang tinggi pada ekstraksi etinil estradiol sebagai senyawa non polar karena mempunyai nilai log  $P_{ow}$  yang besar dan konstanta dielektrik yang rendah. Akan tetapi, nilai tegangan permukaan dan densitas yang kecil menyebabkan heksana mempunyai kestabilan yang rendah

sebagai tetes pelarut organik pada SDME. Oleh karena itu, heksana tidak digunakan sebagai pelarut organik pada analisis berikutnya.

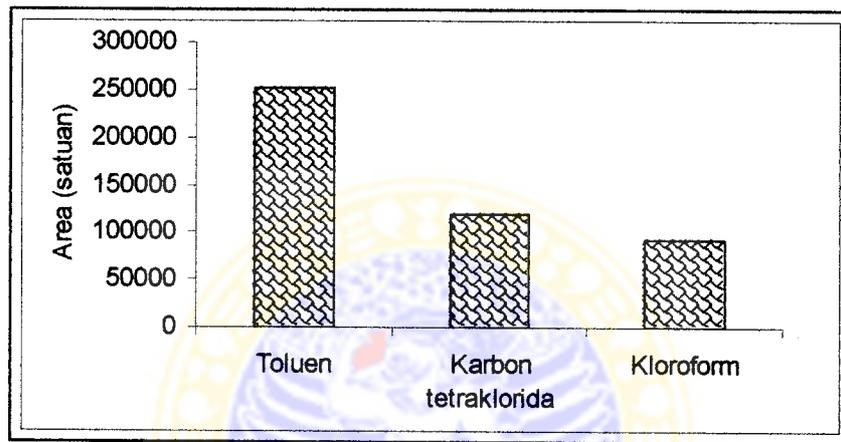
Ditinjau dari harga konstanta dielektrik dan  $\log P_{ow}$ , kloroform, karbon tetraklorida, dan toluena mempunyai selektivitas yang tidak sebegus heksana. Akan tetapi, kemampuan pelarut organik untuk mengekstrak juga dipengaruhi oleh besarnya tegangan permukaan. Semakin tinggi tegangan permukaan suatu pelarut organik menyebabkan semakin besar gaya kohesif yang terjadi pada permukaan sehingga mengakibatkan gaya tarik antar molekul dalam larutan semakin besar. Hal ini menyebabkan semakin banyak analit yang terekstrak pada proses ekstraksi. Besarnya nilai tegangan permukaan juga memperkecil kelarutan dalam air karena semakin besar kelarutan pelarut organik dalam air menyebabkan semakin kecil analit yang terekstrak sehubungan dengan semakin kecilnya tetes pelarut organik selama ekstraksi (Battle dan Nerin, 2004).

Tegangan permukaan yang besar dan densitas yang tinggi menyebabkan tetes ketiga pelarut organik tersebut sangat stabil baik dalam air maupun dalam sampel dengan berat jenis besar. Oleh karena itu, pelarut organik yang digunakan dalam penelitian ini adalah toluen, kloroform, dan karbon tetraklorida.

Hasil optimasi pelarut organik menunjukkan bahwa toluen memberikan area paling besar dibanding kloroform dan karbon tetraklorida. Data area ketiga pelarut organik tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan kurva optimasi pelarut organik dapat dilihat pada Gambar 8.

Tabel 4.3 Data optimasi pelarut organik

<b>Pelarut Organik</b>	<b>Area Rata-Rata (satuan)</b>
Toluen	250.953
Kloroform	92.202,67
Karbon tetraklorida	119.550,67



Gambar 8. Kurva optimasi pelarut organik

Toluen mempunyai nilai koefisien partisi lebih tinggi jika dibandingkan dengan kloroform dan karbon tetraklorida. Konstanta dielektrik toluen tidak serendah karbon tetraklorida, akan tetapi toluen memiliki tegangan permukaan yang tinggi sehingga gaya kohesif yang terjadi lebih tinggi, kelarutan dalam air lebih kecil, dan tetes pelarut organik lebih stabil daripada kloroform dan karbon tetraklorida. Alasan inilah yang menyebabkan toluen mempunyai kemampuan lebih besar dalam menarik etinil estradiol dari larutan

Toluen mempunyai titik didih paling tinggi daripada kloroform dan karbon tetraklorida. Titik didih toluen yang tinggi menyebabkan proses *dryness* memerlukan waktu yang lebih lama dibandingkan kloroform dan karbon

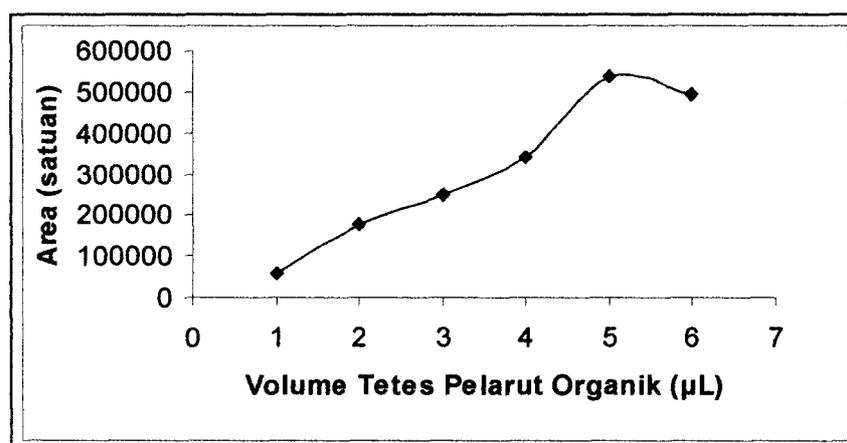
tetraklorida. Untuk penelitian selanjutnya, ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut organik toluen.

#### 4.3.2 Pengaruh volume tetes pelarut organik.

Pengaruh volume tetes pelarut organik dipelajari dengan melakukan ekstraksi SDME selama 12 menit dengan variasi volume tetes toluen sebesar 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7  $\mu\text{L}$ . Data area pengaruh volume tetes pelarut organik dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan kurva optimasi volume tetes pelarut organik dapat dilihat pada Gambar 9.

Tabel 4.4 Data optimasi volume tetes pelarut organik

Volume ( $\mu\text{L}$ )	Area Rata-Rata (satuan)
1	57.634,67
2	175.434
3	250.953
4	333.872,33
5	535.929
6	493.916



Gambar 9. Kurva optimasi volume tetes pelarut organik

Dari data yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin besar volume tetes pelarut organik menyebabkan luas permukaan tetes pelarut organik makin meningkat sehingga semakin banyak analit yang terekstrak. Akan tetapi, pada volume tetes toluen sebesar 6  $\mu\text{L}$  terjadi penurunan area. Berdasarkan uji-t, ternyata tidak terdapat perbedaan area yang bermakna antara volume tetes toluen 5  $\mu\text{L}$  dan 6  $\mu\text{L}$ . Dengan menggunakan volume tetes toluen sebesar 5  $\mu\text{L}$  didapatkan %R sebesar 101,67%. Ini berarti bahwa perolehan kembali etinil estradiol dalam larutan menggunakan volume tetes toluen 5  $\mu\text{L}$  mencapai nilai  $\approx 100\%$  sehingga diduga bahwa jumlah etinil estradiol yang terekstrak dengan menggunakan volume tetes toluen 6  $\mu\text{L}$  tidak jauh berbeda dengan volume tetes toluen 5  $\mu\text{L}$ .

Pada volume tetes toluen sebesar 7  $\mu\text{L}$ , tetes toluen melayang dari ujung syring. Fenomena ini dapat dijelaskan dari gaya-gaya yang bekerja pada tetes pelarut organik yang menggantung di ujung syring. Menurut He dan Lee (1997), terdapat 3 gaya yang bekerja pada tetes pelarut organik di ujung syring, yaitu :

1. Gaya tarik ke atas ( $F_f$ )

$$F_f = V_{\text{tol}} \times \rho_{\text{air}} \times g \dots\dots\dots (7)$$

dengan ketentuan :

$V_{\text{tol}}$  : volume toluen

$\rho_{\text{air}}$  : densitas air = 0,9982  $\text{g/cm}^3$  pada 20°C

$g$  : gaya gravitasi

## 2. Gaya tarik ke bawah ( $F_g$ )

$$F_g = V_{\text{tol}} \times \rho_{\text{tol}} \times g \dots\dots\dots (8)$$

dengan ketentuan :

$V_{\text{tol}}$  : volume toluen

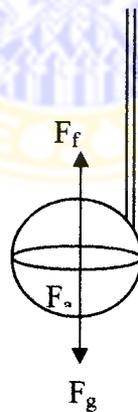
$\rho_{\text{tol}}$  : densitas toluen =  $0,87 \text{ g/cm}^3$  pada  $20^\circ\text{C}$

$g$  : gaya gravitasi

## 3. Gaya adhesi ( $F_a$ )

Gaya adhesi diperoleh dari tegangan permukaan ( $\gamma$ ). Pada kondisi eksperimen, besarnya  $\gamma$  adalah konstan.

Gambaran gaya-gaya tersebut dapat dilihat pada Gambar 10. Pada saat volume toluen semakin besar,  $F_f$  menjadi lebih besar daripada  $F_g$  sehingga tetes toluen akan tertarik ke atas. Hal ini dikarenakan  $\rho_{\text{air}}$  lebih besar daripada  $\rho_{\text{tol}}$ .



Gambar 10. Gaya-gaya yang bekerja pada tetes pelarut organik

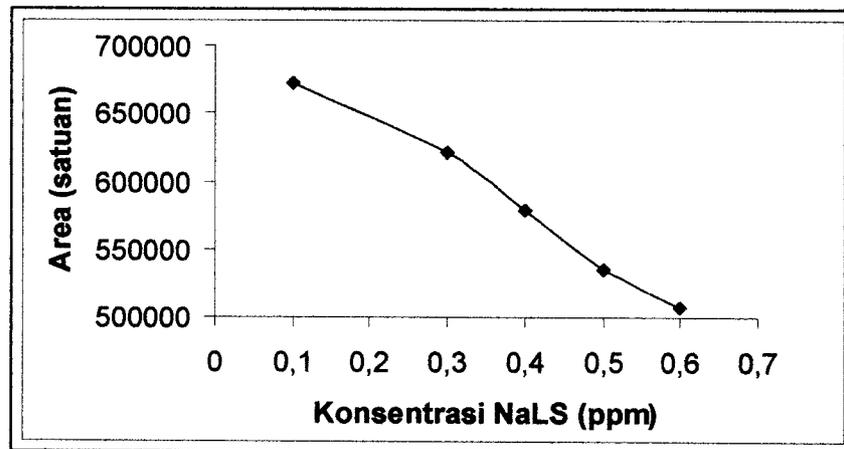
### 4.3.3 Pengaruh konsentrasi NaLS.

Deterjen sebagai sinonim surfaktan merupakan suatu zat aktif permukaan yang berfungsi menurunkan tegangan permukaan. Dalam ekstraksi, adanya deterjen dapat mengurangi kecepatan transfer massa yang terjadi antara analit dan zat pengeksrak (Li *et al.*, 2003). Pengaruh deterjen terhadap ekstraksi menggunakan SDME dipelajari dari ekstraksi SDME dengan variasi konsentrasi NaLS sebagai deterjen sebesar 0,1; 0,3; 0,4; 0,5; dan 0,6 ppm..

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi NaLS, menyebabkan semakin kecil area yang diperoleh. Dengan semakin besarnya konsentrasi NaLS menyebabkan nilai tegangan permukaan makin menurun akibat terbentuk emulsi antara pelarut organik dan larutan. Akibatnya transfer massa analit ke dalam pelarut organik terhalang. Selain itu, adanya pelarut organik yang membentuk emulsi menyebabkan volume tetes pelarut organik berkurang sehingga kapasitas pelarut organik untuk mengekstrak analit juga menjadi berkurang. Data area dari ekstraksi SDME dengan variasi konsentrasi NaLS dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan kurva optimasi konsentrasi NaLS dapat dilihat pada Gambar 11.

Tabel 4.5 Data optimasi konsentrasi NaLS

<b>Konsentrasi (ppm)</b>	<b>Area Rata-Rata (satuan)</b>
0,1	671.661,33
0,3	620.707,33
0,4	579.327,33
0,5	535.747,67
0,6	506.638,67



Gambar 11. Kurva optimasi konsentrasi NaLS

Kondisi optimum yang dipilih untuk konsentrasi NaLS adalah 0,5 ppm bukan konsentrasi NaLS 0,1 ppm yang memberikan area tertinggi. Hal ini dikarenakan berdasar uji-t dinyatakan tidak ada perbedaan area yang bermakna antara 0,1 ppm dan 0,5 ppm. Selain itu, metode SDME hasil optimasi ini akan diaplikasikan untuk analisis etinil estradiol di lingkungan dan konsentrasi deterjen dalam lingkungan adalah sebesar 0,5 ppm sehingga apabila kondisi optimum untuk konsentrasi NaLS lebih kecil daripada 0,5 ppm, maka kurva persamaan hasil optimasi yang diperoleh tidak dapat digunakan untuk analisis etinil estradiol dalam lingkungan. Oleh karena itu, untuk penelitian selanjutnya konsentrasi NaLS yang digunakan adalah sebesar 0,5 ppm.

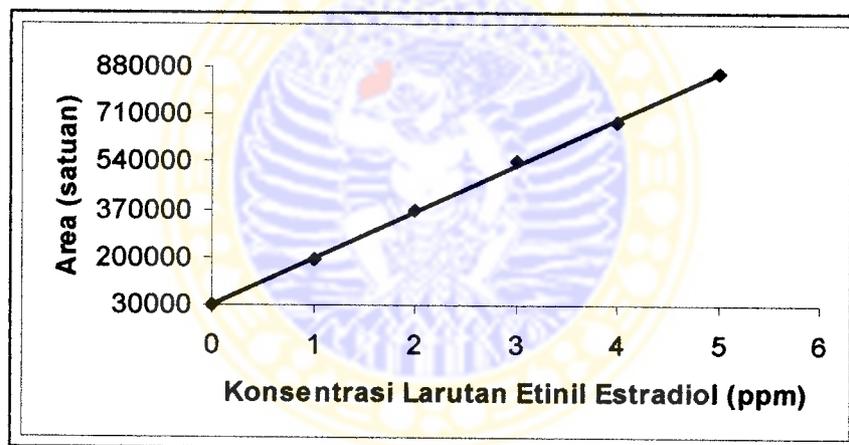
#### 4.3.4 Pembuatan kurva standar etinil estradiol menggunakan SDME.

Kurva standar etinil estradiol menggunakan SDME diperoleh dari pengukuran seri larutan standar etinil estradiol hasil ekstraksi SDME dengan menggunakan pelarut organik toluen, volume tetes pelarut organik sebesar 5  $\mu$ L, dan konsentrasi NaLS sebesar 0,5 ppm. Data pengukuran larutan standar etinil estradiol

menggunakan SDME dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan kurva kalibrasi larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME tampak pada Gambar 12.

Tabel 4.6 Data pengukuran larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME

Konsentrasi (ppm)	Area Rata-Rata (satuan)	KV (%)
1	190.197	14,44
2	365.481	8,18
3	541.712,33	12,54
4	684.152	12,32
5	855.735,33	11,18



Gambar 12. Kurva larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME

Persamaan kalibrasi yang diperoleh dari kurva diatas adalah  $y = 164975 x + 32531$  dengan  $r^2$  sebesar 0,9993. Persamaan kalibrasi ini digunakan untuk menentukan konsentrasi sampel di lingkungan. Berbeda dengan data larutan standar etinil estradiol tanpa menggunakan SDME, %KV data larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME jauh lebih besar yaitu berkisar antara 8% sampai 14%. Ini menunjukkan bahwa presisi metode SDME kurang bagus.

Terdapat 3 alasan yang dapat menjelaskan kurang bagusnya presisi SDME (He dan Lee, 1997). Pertama, kesetimbangan partisi belum dicapai pada saat proses ekstraksi. Kedua, terdapat toluen yang larut selama ekstraksi. Dalam penelitian ini, kurang lebih sebanyak 0,5  $\mu\text{L}$  toluen larut pada waktu ekstraksi selama 12 menit. Ketiga, kesalahan visual yang mungkin terjadi pada saat penarikan toluen dari ujung syring ketika ekstraksi selesai.

Melalui perhitungan, didapatkan limit deteksi pengukuran etinil estradiol menggunakan SDME adalah sebesar 0,19 ppm. Dengan membandingkan nilai limit deteksi pengukuran etinil estradiol tanpa dan dengan SDME menunjukkan bahwa metode SDME mampu meningkatkan sensitivitas alat untuk memberikan respon terhadap adanya analit.

#### **4.3.5 Penentuan faktor pemekatan dan *recovery*.**

Ekstraksi merupakan teknik preparasi sampel yang melibatkan isolasi dan pemekatan analit dalam sampel. Pada penelitian ini, dengan membandingkan volume sampel dan volume akhir ekstraksi diperoleh nilai faktor pemekatan analit teoritis adalah 200 dan faktor pemekatan analit yang terjadi adalah sebesar 199,44.

Banyaknya analit yang terekstrak dapat diketahui dari persen *recovery* (%R). *Recovery* yang didapatkan berkisar antara 96% sampai 103%. Ini berarti bahwa perolehan kembali etinil estradiol sebagai analit dengan menggunakan metode SDME mendekati kedekatan konsentrasi etinil estradiol yang sebenarnya. Nilai persen *recovery* yang melebihi 100% menunjukkan bahwa adanya senyawa lain yang memberikan sinyal yang sama pada waktu retensi etinil estradiol. Persen *recovery* yang diperoleh digunakan untuk mengetahui konsentrasi etinil estradiol

dalam sampel dan juga sebagai pembanding persen *recovery* yang didapat dari spiking sampel untuk mengetahui pengaruh matriks lingkungan terhadap efisiensi ekstraksi menggunakan SDME. Data persen *recovery* larutan standar etinil estradiol dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Data persen *recovery* larutan standar etinil estradiol

<b>Konsentrasi Larutan Etinil Estradiol (ppm)</b>	<b><i>Recovery</i> (%)</b>
1	96
2	101
3	103
4	98,8
5	99,8

#### 4.4 Analisis Sampel

Sampel diambil di 3 wilayah Surabaya Timur yaitu Lebak permai (kecamatan Tambaksari), Gubeng Jaya (kecamatan Gubeng), dan Tenggilis Barat (kecamatan Tenggilis Mejoyo). Pemilihan 3 wilayah tersebut berdasarkan jumlah terbanyak pengguna pil kontrasepsi di Surabaya timur. Data ini diperoleh dari Badan Pemberdayaan Masyarakat dan Keluarga Berencana (BPMKB) kota Surabaya per tahun 2005. Data pengguna Keluarga Berencana (KB) kawasan Surabaya Timur dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Data akseptor KB Wilayah Surabaya Timur tahun 2005

Kecamatan	Pengguna Kontrasepsi (orang)						
	IUD	MOP	MOW	IMP	Suntik	Pil	KD
Rungkut	1.997	26	1.446	254	9.207	2.527	427
Gubeng	5.489	27	1.808	280	4.884	3.714	649
Sukolilo	2.327	26	1.121	363	5.371	2.694	275
Tambaksari	4.456	14	2.906	1.085	13.933	5.864	701
Tenggilis Mejoyo	1.168	18	875	311	4.791	2.978	104
Gunung anyar	1.026	10	560	191	4.921	1.117	171

Sumber : BPMKB kota Surabaya

Keterangan :

IUD : *Intra Uterine Device*; alat kontrasepsi yang dipasang dalam rahim; spiral

MOP : Medis Operasi Pria; vasektomi

MOW : Medis Operasi Wanita; tubektomi

IMP : implant; susuk

KD : kondom

Sampel disimpan pada suhu dingin dan analisis dilakukan paling lama 2 hari setelah pengambilan sampel. Ini dilakukan untuk menghindari degradasi etinil estradiol oleh mikroba dalam sampel. Sebelum dianalisis, sampel disaring sebanyak dua kali untuk menghilangkan kotoran dan partikulat yang memungkinkan menyebabkan penyumbatan pada HPLC. Sampel diekstraksi dengan SDME menggunakan pelarut organik toluen dan volume tetes sebesar 5  $\mu$ L. Penambahan NaLS sebesar 0,5 ppm tidak dilakukan dalam analisis sampel, karena telah diasumsikan bahwa konsentrasi deterjen di lingkungan adalah sebesar 0,5 ppm.

Dari pengamatan selama proses ekstraksi, bentuk tetesan toluen dalam sampel tidak se-rigid bentuk tetesan toluen pada larutan standar. Hal ini diduga dikarenakan terdapat perbedaan berat jenis antara sampel dan toluen yang menyebabkan toluen mempunyai kecenderungan untuk tertarik ke atas. Berat jenis sampel lebih besar karena terdiri dari banyak partikulat dan senyawa organik dibanding larutan standar yang hanya terdiri dari akuabides, NaLS dan NaCl.

Dari hasil analisis, diperoleh data analisis sampel seperti tampak pada Tabel 4.9. Nilai rata-rata yang diperoleh kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan kurva kalibrasi larutan standar menggunakan SDME. Hasil substitusi yang didapat untuk sampel I dan III adalah negatif. Sedangkan, pada sampel II tidak ditemukan puncak etinil estradiol dalam kromatogram. Ini berarti, dapat dikatakan bahwa etinil estradiol dalam air limbah domestik daerah Lebak Permai, Gubeng Jaya, dan Tenggilis Barat mempunyai konsentrasi lebih kecil dari 0,19 ppm atau memang tidak terdapat etinil estradiol di dalamnya.

Tabel 4.9 Data analisis sampel

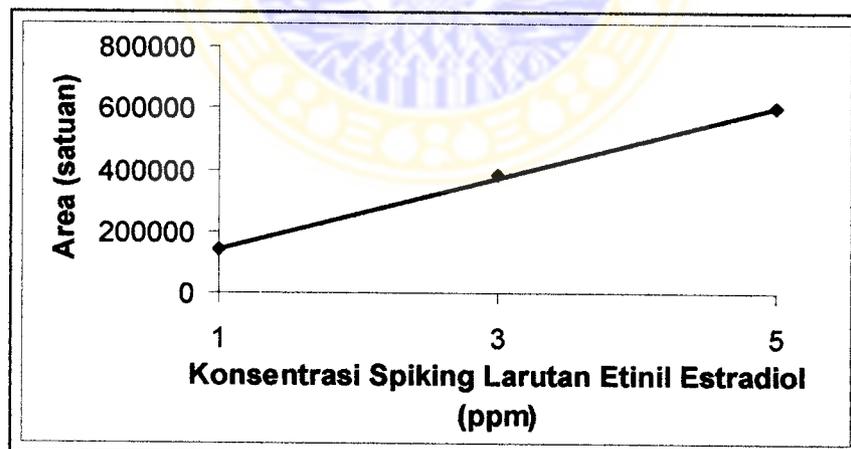
<b>Sampel</b>	<b>Area Rata-Rata (satuan)</b>
Lebak Permai (I)	18.916
Gubeng Jaya (II)	-
Tenggilis Barat (III)	6327,67

#### 4.5 Analisis Spiking Sampel

Spiking sampel bertujuan untuk membantu meningkatkan sinyal analisis konsentrasi analit yang terlalu kecil dan untuk mengetahui pengaruh matriks lingkungan terhadap efisiensi ekstraksi. Spiking sampel dilakukan dengan menggunakan konsentrasi etinil estradiol 1, 3, dan 5 ppm. Data spiking sampel dan persen *recovery* dapat dilihat pada Tabel 4.10, 4.11, dan 4.12 dan kurva spiking sampel dapat dilihat pada Gambar 13, 14, dan 15.

Tabel 4.10 Data spiking sampel I (Lebak Permai)

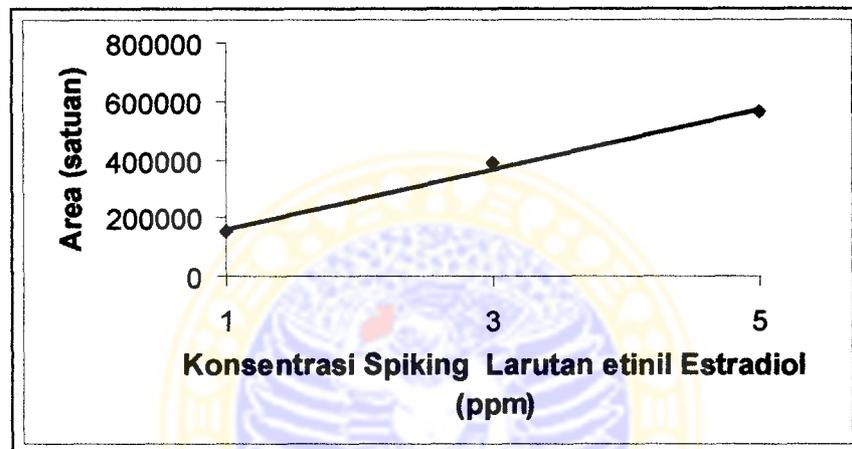
Spiking (ppm)	Area Rata-Rata (satuan)	Recovery (%)
1	139.765,67	65
3	380.952,33	70,33
5	600.947	68,8



Gambar 13. Kurva spiking sampel I (Lebak Permai)

Tabel 4.11 Data spiking sampel II (Gubeng Jaya)

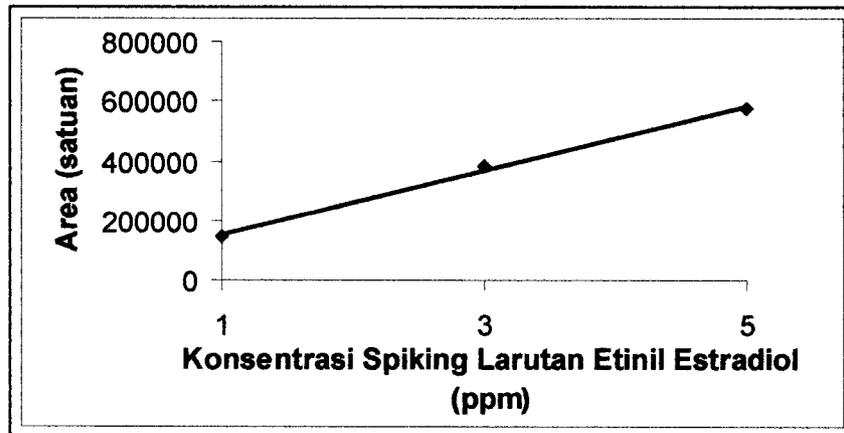
<b>Spiking (ppm)</b>	<b>Area Rata-Rata (satuan)</b>	<b>Recovery (%)</b>
1	152.774,67	72,88
3	391693	72,67
5	562.216,33	64,2



Gambar 14. Kurva spiking sampel II (Gubeng Jaya)

Tabel 4.12 Data spiking sampel III (Tenggilis Barat)

<b>Spiking (ppm)</b>	<b>Area Rata-Rata (satuan)</b>	<b>Recovery (%)</b>
1	147.782,67	69,86
3	383.178,67	70,67
5	573.696,33	65,6



Gambar 15. Kurva spiking sampel III (Tenggilis Barat)

Hasil *recovery* yang diperoleh berkisar antara 64% sampai 73%. Nilai ini lebih kecil dibanding *recovery* yang didapat dari larutan standar. Kandungan senyawa organik dan padatan dalam air limbah (Lambropoulou dan Albanis, 2004), termasuk asam fulvat, asam humat, dan garam anorganik (Lopez-Blanco *et al.*, 2003) dapat mengganggu penentuan analit sehingga mengurangi *recovery*. Kandungan limbah domestik dapat dilihat pada Tabel 4.13.

Tabel 4.13 Kandungan limbah domestik

<b>Parameter</b>	<b>Jumlah (mg/L)</b>
<i>Chemical Oxygen Demand (COD)</i>	750-850
<i>Biological Oxygen Demand (BOD)</i>	250-350
Total Padatan	1890-2060
Total Nitrogen	35
Total Fosfor	10
Asam Humat*	2-10

Sumber : Karthikeyan dan Gogulakrishnan, 2001; \*Takahashi dan Minai, 2004

Adanya senyawa organik termasuk asam humat (Lambropoulou dan Albanis, 2004) dan padatan dapat menurunkan efisiensi ekstraksi karena membatasi difusi antara analit dan pelarut organik. Selain itu, senyawa organik dalam sampel yang mempunyai kesamaan sifat kenonpolaran dengan toluen, memungkinkan juga ikut terekstrak sehingga mengakibatkan etinil estradiol yang terserap dalam toluen menjadi berkurang. Ini berarti, matriks air limbah domestik mempengaruhi efisiensi ekstraksi.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Dari hasil penelitian dapat diambil kesimpulan :

1. kondisi optimum NaLS sebagai deterjen pada analisis etinil estradiol dengan SDME menggunakan instrumen analisis HPLC detektor UV adalah sebesar 0,5 ppm,
2. pelarut organik toluen dengan volume tetes sebesar 5  $\mu$ L memberikan kondisi optimum pada analisis etinil estradiol dengan SDME menggunakan instrumen analisis HPLC detektor UV,
3. metode SDME yang telah dioptimasi dapat digunakan untuk menganalisis sampel yang mengandung etinil estradiol dengan konsentrasi lebih besar 0,19 ppm.

#### **5.2 Saran**

Perlu dipelajari parameter-parameter lain yang mempengaruhi kinerja SDME seperti waktu ekstraksi dan kecepatan pengadukan, serta pengaruh matriks lingkungan selain deterjen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, Richard, 1991, *Sample Pretreatment and Separation*, John Willey & Sons, New York
- Anonim, 2001, *The Merck Index 13<sup>rd</sup> Edition, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, Merck & Co. Inc., White House Station, NJ
- Battle, R., dan Nerin, C., 2004, *Application of Single Drop Microextraction to The Determination of Dialkyl Phthalate Esters in Food Simulants*, *Journal of Chromatography A*, Vol 1045, 29-35
- Brauen, P., Mueder, M., Schraeder, St., Pupp, P., Kusch, P., Engewald, W., 2003, *Trace Analysis of Technyl Nonylphenol, Bisphenol A, and 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol in Wastewater Using Solid-Phase Micro Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, Vol 988, 41-51
- Céspedes, R., Petrovic, M., Raldua, D., Saura, U., Pina, B., Lacorte, S., Viana, P., Barcelo, D., 2004, *Integrated Procedure For Determination of Endocrine-Disrupting Activity in Surface Water and Sediments By Use of The Biological Technique Recombinant Yeast Assay and Chemical Analysis By LC-ESI-MS*, *Anal bioanal Chem*, Vol 378, 697-708
- Chan, A., dan Lyn, J. E., 1983, *Surfactant and Detergent System*, *Encyclopedia of Chemical Technology*, third edition, Vol 22, 332-423
- Colombini, V., Bancon-Montigny, C., Yang, L., Maxwell, P., Sturgeon, R. E., Mester, Z., 2005, *Headspace Single-Drop Microextraction for The Detection of Organotin Compounds*, *Talanta*, Vol 63, 555-560
- Das P., Gupta, M., Archana, J., Krishna, K. V., 2004, *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
- De Alda, M. J. L., dan Barcelo, D., 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

- Durant, A. A., Fente, C. A., Franco, C. M., Vazquez, B. I., Mayo, S., Cepeda, A., 2002, ***Development of A Diphasic Dialysis Method For Extraction/Purification of Residues of Ethinyl Estradiol in Hair of Cattle, and Determination By Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry***, *Journal of chromatography B*, Vol 766, 251-256
- Facemire, C. F., Gross, T. S., dan Guillette, L. J. J., 1995, ***Reproductive Impairment in The Florida Panther: Nature or Nurture***, *Environmental Health Perspect*, Vol 103, 79-86
- Fry, D. M., dan Toone, C. K., 1981, ***DDT-Induced Feminization of Gull Embryos***, *Science*, Vol 213, 922-924
- Gil, S., Fragueiro, S., Lavilla, I., Bendicho, C., 2005, ***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
- Giusti, R. M., Iwamoto, K., Hatch, E. E., 1995, ***Diethylstilbestrol Revisited: A Review of The Long-Term Health Effects***, *Ann Intern Med*, Vol 122, 778-88
- Giwercman, A., Carlsen, E., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1993, ***Evidence For Increasing Incidence of Abnormalities of The Human Testis: A Review***, *Env. Health Perspect*, Vol 101, 65-71.
- Gomes, R. L., Avcioglu, E., Schrimshaw, M. D., Lester, J. N., 2004, ***Steroid Estrogen Determination in Sediment and Sewage Sludge: A Critique of Sample Preparation and Chromatographic/Mass Spectrometry Considerations, Incorporating A Case Study in Method Development***, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 23, 737-744
- Guillette, L. J. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., Woodward, A. R., 1994, ***Developmental Abnormalities of The Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators From Contaminated and Control Lakes in Florida***, *Environmental Health Perspect*, Vol 102, 680-688
- Hayun, Harahap, Y., Aziza, C. N., 2004, ***Penetapan Kadar Sakarin, Asam Benzoat, Asam sorbat, Kafeina, dan Aspartam di Dalam Beberapa Minuman Ringan Bersoda Secara KCKT***, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol I No 3, 148-159

- 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
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P., dan Sumpter, J. P., 1996, ***Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic, Alkylphenolic Chemicals***. *Env. Tox. Chem*, Vol 15, 194-202
- Jurgens, M. D., Johnson, A. C., Williams, R. J., 1999. ***Fate and behavior of Steroid Oestrogens in Rivers: A Scoping Study***. R&D Technical Report Environment Agency, London, United Kingdom, 161
- Jurgens, M. D., Holthaus, K. I. E., Johnson, A.C., Smith, J. J. L., Hetheridge, M., Williams, R. J., 2002, ***The Potential for Estradiol and Ethinyl Estradiol Degradation in English Rivers***, *Environmental Toxicology Chemistry*, Vol 21, 480-488
- Karthikeyan, S., dan Gogulakrishnan, G., 2001, ***Studies on COD Removal Using Fly Ash***, Centre for Environmental Studies Anna University, Chennai
- Kaykhaii M., Nazari, S., Chamsaz, M., 2005, ***Determination of Aliphatic Amines in Water By Gas Chromatography Using Headspace Solvent Microextraction***, *Talanta*, Vol 65, 223-228
- Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, L. E., Kemppainen, J. A., Wilson, E. M., 1995. ***Persistent DDT Metabolite p, p'-DDE Is A Potent Androgen Receptor Antagonist***, *Nature*, Vol 375, 581-585
- Kuster, M., de Alda, M. J. L., Barcelo, D., 2004, ***Analysis and Distribution of Estrogens and Progestogens in Sewage Sludge, Soils and Sediments***, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 23, 790-798
- Lai, K. M., Johnson, K. L., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N., 2000, ***Binding of Waterborne Steroid Estrogens to Solid Phases in River and Estuarine Systems***, *Environmental Science and Technology*, Vol 34, 3890-3894
- Lambropoulou, D. A., dan Albanis, T. A., 2004., ***Application of Solvent Microextraction in A Single Drop for The Determination of New Antifouling Agents in Water***, *Journal of Chromatography A*, Vol 1049, 17-23
- Li, Xiaojin., Mo, Zai-sha., Fei, W., 2003, ***Effects of Surface-Active Agents on Mass Transfer of A Solute Into Single Buoyancy Driven Drops in Solvent Extraction Systems***, *Chemical Engineering Science*, Vol 58, 3793-3806

- Lopez-Blanco, M. C., Blanco-Cid, S., Cancho-Grande, B., Simal-Gandara, J., 2003, *Application of Single-Drop Microextraction and Comparison with Solid-Phase Microextraction and Solid-Phase Extraction for The Determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ - Endosulfan in Water Samples by Gas Chromatography Electron Capture Detection*, *Journal of Chromatography A*, Vol 984, 245-252
- Lord, H., dan Pawliszyn, J., 2000, *Microextraction of Drugs*, *Journal of Chromatography A*, Vol 902, 17-63
- Mao, L., Sun, C., Zhang, H., Li, Y., Wu, D., 2004, *Determination of Environmental Estrogens in Human Urine By High Performance Liquid Chromatography After Fluorescent Derivatization With p-Nitro Benzoyl Chloride*, *Analytica Chimica Acta*, Vol 522, 241-246
- Mozaz, R.S., de Alda, M. J. L., Barcelo, D., 2004, *Monitoring of Estrogens Pesticides and Bisphenol A in Natural Waters and Drinking Water Treatment Plants By Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, Vol 1045, 85-92
- Mulja, M., dan Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, Airlangga University Press, Surabaya
- Nugroho, Munajad, 2001, *Studi Penentuan Laju Biodegradasi Limbah Deterjen di Kali Mas Surabaya*, Skripsi, jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga, Surabaya
- Psillakis, E., dan Kalogerakis, N., 2001, *Solid Phase Microextraction Versus Single Drop Microextraction for The Analysis of Nitro Aromatic Explosive in Water Sample*, *Journal of Chromatography A*, Vol 938, 113-120
- Psillakis, E., dan Kalogerakis, N., 2002, *Development in Single-Drop Microextraction*, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 21, 53-63
- Shaw. D.J., 1970, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, Butterworths and Co. Ltd., London
- Supriyanto, G., 2005, *Chromatomebrane Methode Applied in Pharmaceuticals Analysis*, Logos Verlag, Berlin
- Takahashi, Y., dan Minai, Y., 2004, *The Effects of  $\text{Na}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and  $\text{Ca}^{2+}$  Ions on The Formation of Eu(III)-Humate Complex*, *Journal of Nuclear and Radiochemical Science*, Vol 5, 37-44

- Tang, S. L., dan Lee, T. H., 2002. *Treatment of Mixed (Fresh and Salt) Wastewater Sustainable Environmental Sanitation and Water Services*, Kolkata, india
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Habere, K., Williams, R. D., Servos, M., 1999, *Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants-I, Investigations in Germany, Canada, and Brazil*, *The Science of The Total Environment*, Vol 225, 81-90
- Ternes, T. A., Henrik A., Daniel G., Matthias B., 2002, *Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS*, *Analytical Chemistry*, Vol 74, 3498-3504

[www.trimen.pl/witek/clecze./old-liquids.html](http://www.trimen.pl/witek/clecze./old-liquids.html) ; 20 Juni 2006



## LAMPIRAN

### Lampiran 1

**Data pengukuran larutan standar etinil estradiol tanpa dan dengan menggunakan SDME**

Data pengukuran larutan standar etinil estradiol tanpa SDME

<b>Konsentrasi</b> <b>Area</b>	<b>1 ppm</b>	<b>2 ppm</b>	<b>3 ppm</b>	<b>4 ppm</b>	<b>5 ppm</b>
Replikasi I	22.220	35.022	51.295	64.652	87.441
Replikasi II	22.458	35.035	51.478	64.500	82.201
Replikasi III	22.244	35.430	50.058	63.883	83.106
<b>Rata-Rata</b>	<b>22.307,33</b>	<b>35.162,33</b>	<b>50.943,67</b>	<b>64.345</b>	<b>84.249,33</b>
KV (%)	0,59	0,66	1,52	0,63	3,32

Data pengukuran larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME

<b>Konsentrasi</b> <b>Area</b>	<b>1 ppm</b>	<b>2 ppm</b>	<b>3 ppm</b>	<b>4 ppm</b>	<b>5 ppm</b>
Replikasi I	164.087	387.330	620.108	777.339	745.410
Replikasi II	187.651	331.400	504.225	662.004	915.951
Replikasi III	218.853	377.713	500.774	613.113	905.845
<b>Rata-Rata</b>	<b>190.197</b>	<b>365.481</b>	<b>541.712,33</b>	<b>684.152</b>	<b>855.735,33</b>
KV (%)	14,44	8,18	12,54	12,32	11,18

Keterangan :

% KV : persen koefisien variasi

## Lampiran 2

## Data optimasi parameter-parameter analitik

Data optimasi pelarut organik

<b>Pelarut Organik</b> <b>Area</b>	<b>Toluen</b>	<b>Kloroform</b>	<b>Karbon tetraklorida</b>
Replikasi I	268.089	85.891	127.883
Replikasi II	248.866	98.415	118.283
Replikasi III	235.904	92.302	112.486
<b>Rata-Rata</b>	<b>250.953</b>	<b>92.202,67</b>	<b>119.550,67</b>

Data optimasi volume tetes pelarut organik

<b>Volume</b> <b>Area</b>	<b>1 <math>\mu</math>L</b>	<b>2 <math>\mu</math>L</b>	<b>3 <math>\mu</math>L</b>	<b>4 <math>\mu</math>L</b>	<b>5 <math>\mu</math>L</b>	<b>6 <math>\mu</math>L</b>
Replikasi I	53.222	174.147	268.089	324.176	500.443	607.397
Replikasi II	57.121	185.411	248.866	323.481	539.173	410.382
Replikasi III	62.561	166.744	235.904	353.960	568.171	463.969
<b>Rata-Rata</b>	<b>57.634,67</b>	<b>175.434</b>	<b>250.953</b>	<b>333.872,33</b>	<b>535.929</b>	<b>493.916</b>

Data optimasi konsentrasi NaLS

<b>Konsentrasi</b> <b>Area</b>	<b>0,1 ppm</b>	<b>0,3 ppm</b>	<b>0,4 ppm</b>	<b>0,5 ppm</b>	<b>0,6 ppm</b>
Replikasi I	855.943	750.827	679.419	573.926	518.031
Replikasi II	667.591	565.047	543.758	457.025	586.843
Replikasi III	491.450	546.248	514.805	576.292	415.042
<b>Rata-Rata</b>	<b>671.661,33</b>	<b>620.707,33</b>	<b>579.327,33</b>	<b>535.747,67</b>	<b>506.638,67</b>

## Lampiran 3

## Data analisis dan spiking sampel

Data analisis sampel

<b>Area</b> \ <b>Sampel</b>	<b>I Lebak Permai</b>	<b>II Gubeng Jaya</b>	<b>III Tenggilis Barat</b>
Replikasi I	19.463	-	-
Replikasi II	11.445	-	-
Replikasi III	25.840	-	18.983
<b>Rata-Rata</b>	<b>18.916</b>	-	<b>6.327,67</b>

Data spiking sampel I (Lebak Permai)

<b>Area</b> \ <b>Spiking</b>	<b>1 ppm</b>	<b>3 ppm</b>	<b>5 ppm</b>
Replikasi I	95.909	324.680	567.616
Replikasi II	151.723	401.358	576.267
Replikasi III	171.665	416.819	658.958
<b>Rata-Rata</b>	<b>139.765,67</b>	<b>380.952,33</b>	<b>600.947</b>
<b>R (%)</b>	<b>65</b>	<b>70,33</b>	<b>68,8</b>

Data spiking sampel II (Gubeng Jaya)

<b>Area</b> \ <b>Spiking</b>	<b>1 ppm</b>	<b>3 ppm</b>	<b>5 ppm</b>
Replikasi I	156.785	549.547	655.767
Replikasi II	160.419	245.511	407.848
Replikasi III	141.120	380.021	623.034
<b>Rata-Rata</b>	<b>152.774,67</b>	<b>391.693</b>	<b>562.216,33</b>
<b>R (%)</b>	<b>72,88</b>	<b>72,67</b>	<b>64,2</b>

Data spiking sampel III (Tenggilis Barat)

<b>Spiking Area</b>	<b>1 ppm</b>	<b>2 ppm</b>	<b>3 ppm</b>
Replikasi I	173.813	344.412	485.038
Replikasi II	112.246	436.545	551.124
Replikasi III	157.289	368.579	684.927
<b>Rata-Rata</b>	<b>147.782,67</b>	<b>383.178,67</b>	<b>573.696,33</b>
<b>R (%)</b>	<b>69,86</b>	<b>70,67</b>	<b>65,6</b>



**Lampiran 4****Pengolahan data****Penentuan presisi (%KV)**

Larutan standar etinil estradiol 1 ppm tanpa SDME

n	x	(x - $\bar{x}$ )	(x - $\bar{x}$ ) <sup>2</sup>
1	22.220	-87,33	7.626,53
2	22.458	150,67	22.701,45
3	22.244	-63,33	4.010,69
$\bar{x} = 22.307,33$			$\sum (x - \bar{x})^2 = 34.338,67$

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

$$= \sqrt{\frac{34.338,67}{3 - 1}}$$

$$= 131,03$$

$$\%KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \%$$

$$= \frac{131,03}{22.307,33} \times 100 \%$$

$$= 0,59 \%$$

Keterangan :

%KV : persen koefisien variasi

SD : standar deviasi

 $\bar{x}$  : nilai rata-rata pengukuran;  $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$ 

x : nilai setiap pengukuran

n : jumlah pengukuran

Cara yang sama juga dilakukan untuk perhitungan %KV seri larutan standar etinil estradiol yang lain tanpa dan dengan menggunakan SDME.

**Penentuan sensitivitas (LOD)**

Larutan standar etinil estradiol tanpa SDME

<b>x</b>	<b>y</b>	<b><math>\hat{y}</math></b>	<b><math>(y - \hat{y})^2</math></b>
1	22.307,33	20.788,5	2.306.844,57
2	35.162,33	36.095,5	870.806,25
3	50.943,67	51.402,5	210.524,97
4	64.345	66.709,5	5.590.860,25
5	84.249,33	82.016,5	4.985.529,81
			$\Sigma(y - \hat{y})^2 = 13.964.565,85$

$$y = 15.307 x + 5.481,5$$

$$\begin{aligned}\hat{y}_{1\text{ ppm}} &= (15.307 \times 1) + 5481,5 \\ &= 20.788,5\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\hat{y}_{2\text{ ppm}} &= (15.307 \times 2) + 5481,5 \\ &= 36.095,5\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\hat{y}_{3\text{ ppm}} &= (15.307 \times 3) + 5481,5 \\ &= 51.402,5\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\hat{y}_{4\text{ ppm}} &= (15.307 \times 4) + 5481,5 \\ &= 66.709,5\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\hat{y}_{5\text{ ppm}} &= (15.307 \times 5) + 5481,5 \\ &= 82.016,5\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}S_{y/x} &= \sqrt{\frac{\Sigma(y - \hat{y})^2}{n-2}} \\ &= \sqrt{\frac{13.964.565,85}{5-2}} \\ &= \sqrt{4.654.855,28} = 2157,51\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}Y_{\text{LOD}} &= a + 3 S_{bl} \\ &= 5481,5 + 3 \times 2157,51 \\ &= 11.954,03\end{aligned}$$

$$y = 15.307 x + 5.481,5$$

$$11.954,03 = 15.307 x + 5481,5$$

$$6472,53 = 15.307 x$$

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

Jadi, limit deteksi pengukuran larutan standar etinil etinil estradiol tanpa SDME adalah sebesar 0,42 ppm

Keterangan :

$Y_{LOD}$  : sinyal konsentrasi terkecil yang dapat dideteksi

$Y_{bl}$  : intersep kurva kalibrasi

$$S_{bl} := S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y - \hat{y})^2}{n-2}}$$

$y$  : sinyal analisis

$\hat{y}$  : nilai hasil substitusi  $x$  ke dalam persamaan kurva kalibrasi

$n$  : jumlah pengukuran

Cara yang sama juga dilakukan untuk perhitungan limit deteksi larutan standar etinil estradiol dengan menggunakan SDME.

**Penentuan akurasi (%R)**

Larutan standar etinil estradiol 1 ppm dengan SDME

<b>Konsentrasi</b> <b>Area</b>	<b>1 ppm</b>
Replikasi I	164.087
Replikasi II	187.651
Replikasi III	218.853
<b>Rata-Rata</b>	<b>190.197</b>

$$y = 164.975 x + 32.531$$

$$190.197 = 164.975 x + 32.531$$

$$157.666 = 32.531 x$$

$$x = C_e = 0,96 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \%R &= \frac{C_e}{C_s} \times 100 \% \\ &= \frac{0,96}{1} \times 100 \% \\ &= 96 \% \end{aligned}$$

dengan ketentuan :

y : sinyal analisis

x : konsentrasi

%R : persen *recovery*

$C_e$  : pengukuran konsentrasi setelah ekstraksi

$C_s$  : konsentrasi sebenarnya

Cara yang sama juga dilakukan untuk perhitungan %R larutan standar etinil estradiol yang lain dengan menggunakan SDME, dan larutan spiking sampel I, II, dan III.

### Penentuan faktor pemekatan teoritis dan faktor pemekatan sebenarnya

$$\begin{aligned}EF_{th} &= \frac{V_s}{V_e} \\ &= \frac{20 \text{ mL}}{0,1 \text{ mL}} \\ &= 200\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}EF_{tr} &= EF_{th} \times R \\ &= 200 \times 0.9972 \\ &= 199.44\end{aligned}$$

Keterangan :

$EF_{th}$  : faktor pemekatan teoritis

$EF_{tr}$  : faktor pemekatan sebenarnya

$V_s$  : volume sampel

$V_e$  : volume akhir setelah ekstraksi

R : *recovery* rata-rata

**Lampiran 5****Uji-t antara area volume tetes toluen 5  $\mu$ L dan 6  $\mu$ L**Volume tetes toluen 5  $\mu$ L

$n_1$	$x_1$	$(x_1 - \bar{x}_1)$	$(x_1 - \bar{x}_1)^2$
1	500.443	- 35.486	1.259.256.196
2	539.173	3.244	10.523.536
3	568.171	32.242	1.039.546.564
$\bar{x} = 535.929$			$JK_1 = 2.309.326.296$

$$\begin{aligned}
 S_1^2 &= \frac{JK_1}{n_1 - 1} \\
 &= \frac{2.309.326.296}{3 - 1} \\
 &= 1.154.663.148
 \end{aligned}$$

Volume tetes toluen 6  $\mu$ L

$n_2$	$x_2$	$(x_2 - \bar{x}_2)$	$(x_2 - \bar{x}_2)^2$
1	607.397	113.481	1,287793736.10 <sup>10</sup>
2	410.382	- 83.534	6.977.929.156
3	463.969	- 29.947	896.822.809
$\bar{x} = 493.916$			$JK_2 = 2,075268933.10^{10}$

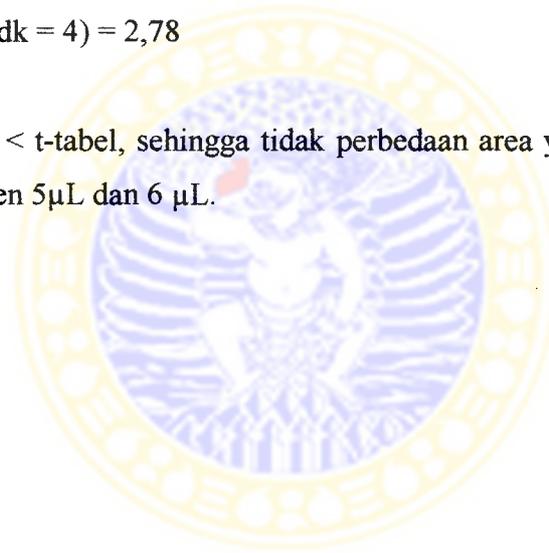
$$\begin{aligned}
 S_2^2 &= \frac{JK_2}{n_2 - 1} \\
 &= \frac{2,075268933.10^{10}}{3 - 1} \\
 &= 1.037634466.10^{10}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 t - \text{hit} &= \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \\
 &= \frac{|535.929 - 493.916|}{\sqrt{\frac{1.154.663.148}{3} + \frac{1,037634466 \cdot 10^{10}}{3}}} \\
 &= \frac{42.013}{61.997,33} = 0,68
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 dk &= n_1 + n_2 - 2 \\
 &= 3 + 3 - 2 = 4
 \end{aligned}$$

$$t\text{-tabel} (\alpha = 0,05; dk = 4) = 2,78$$

Oleh karena  $t\text{-hit} < t\text{-tabel}$ , sehingga tidak perbedaan area yang bermakna antara volume tetes toluen  $5\mu\text{L}$  dan  $6\mu\text{L}$ .



**Lampiran 6****Uji-t antara area konsentrasi NaLS 0,1 ppm dan 0,5 ppm**

Konsentrasi NaLS 0,1 ppm

$n_1$	$x_1$	$(x_1 - \bar{x}_1)$	$(x_1 - \bar{x}_1)^2$
1	855.943	184.281,67	$3.39597339 \cdot 10^{10}$
2	667.591	- 4.070,33	16.567.586,31
3	491.450	- 180.211,33	$3,247612346 \cdot 10^{10}$
$\bar{x} = 671.661,33$			$JK_1 = 6,645242495 \cdot 10^{10}$

$$\begin{aligned}
 S_1^2 &= \frac{JK_1}{n_1 - 1} \\
 &= \frac{6,645242495 \cdot 10^{10}}{3 - 1} \\
 &= 3,322621248 \cdot 10^{10}
 \end{aligned}$$

Konsentrasi NaLS 0,5 ppm

$n_2$	$x_2$	$(x_2 - \bar{x}_2)$	$(x_2 - \bar{x}_2)^2$
1	573.926	38.178,33	1.457.584.882
2	457.205	- 78.542,67	6.168.951.011
3	576.292	40.544,33	1.643.842.695
$\bar{x} = 535.747,67$			$JK_2 = 9.270.378.588$

$$\begin{aligned}
 S_2^2 &= \frac{JK_2}{n_2 - 1} \\
 &= \frac{9.270.378.588}{3 - 1} \\
 &= 4.635.189.294
 \end{aligned}$$

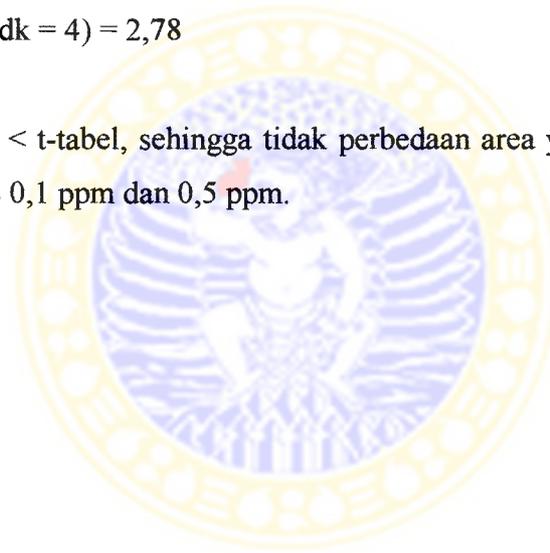
$$\begin{aligned}
 t - \text{hit} &= \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \\
 &= \frac{|671.661,33 - 535.747,67|}{\sqrt{\frac{3,322621248 \cdot 10^{10}}{3} + \frac{4.635.189.294}{3}}} \\
 &= \frac{135.913,66}{112.340,853} = 1,21
 \end{aligned}$$

$$dk = n_1 + n_2 - 2$$

$$= 3 + 3 - 2 = 4$$

$$t\text{-tabel} (\alpha = 0,05; dk = 4) = 2,78$$

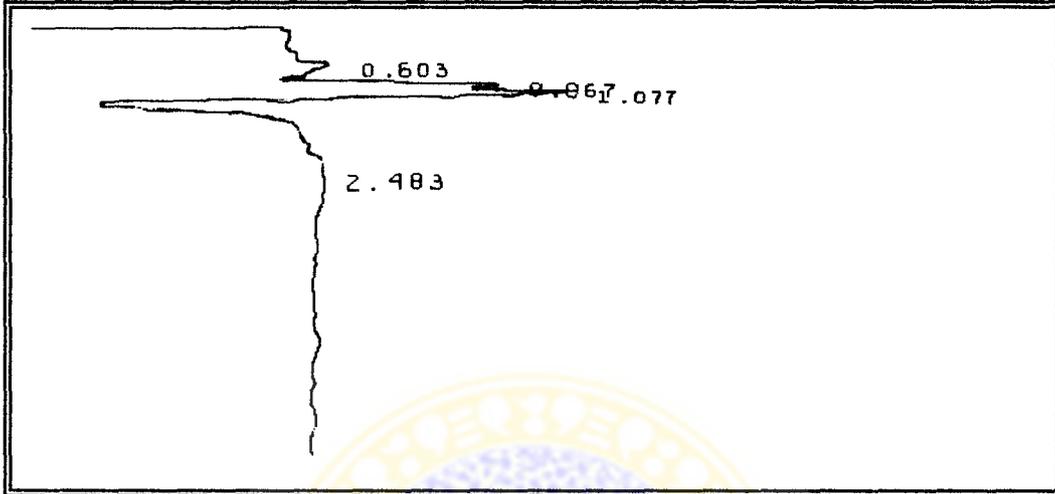
Oleh karena  $t\text{-hit} < t\text{-tabel}$ , sehingga tidak perbedaan area yang bermakna antara konsentrasi NaLS 0,1 ppm dan 0,5 ppm.



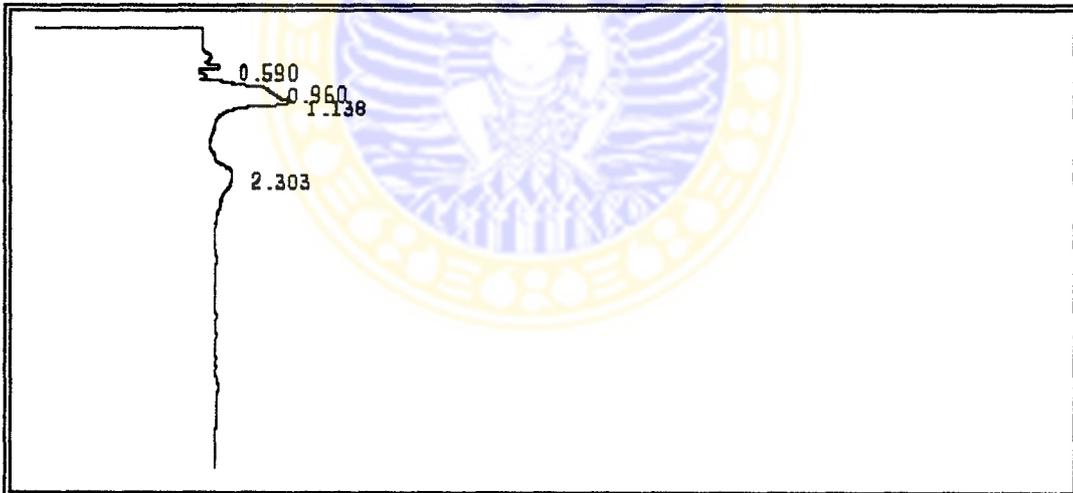
## Lampiran 7

### Gambar kromatogram

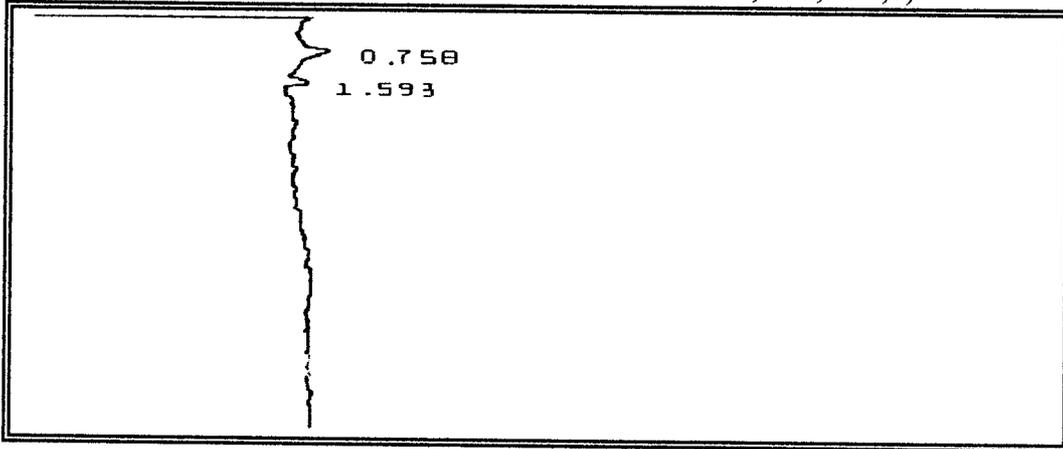
Kromatogram metanol



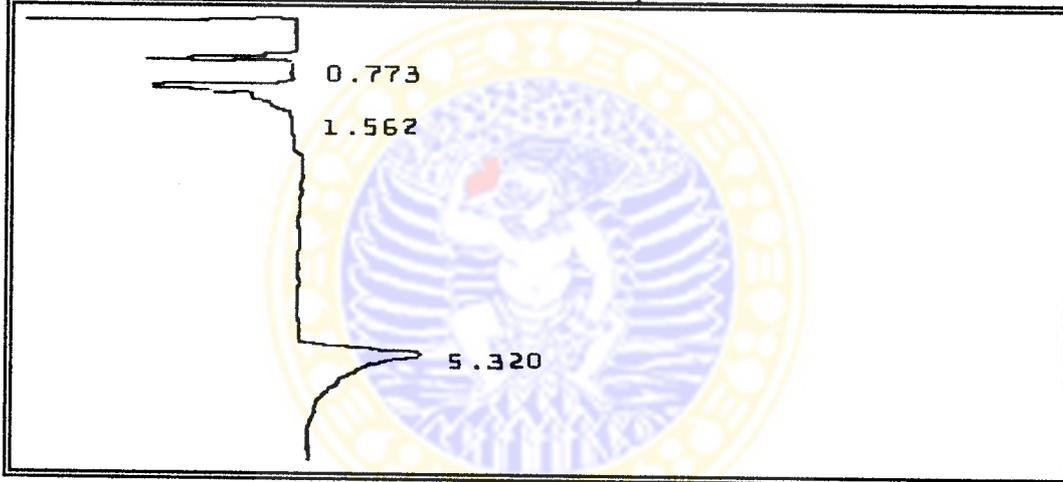
Kromatogram asetonitril



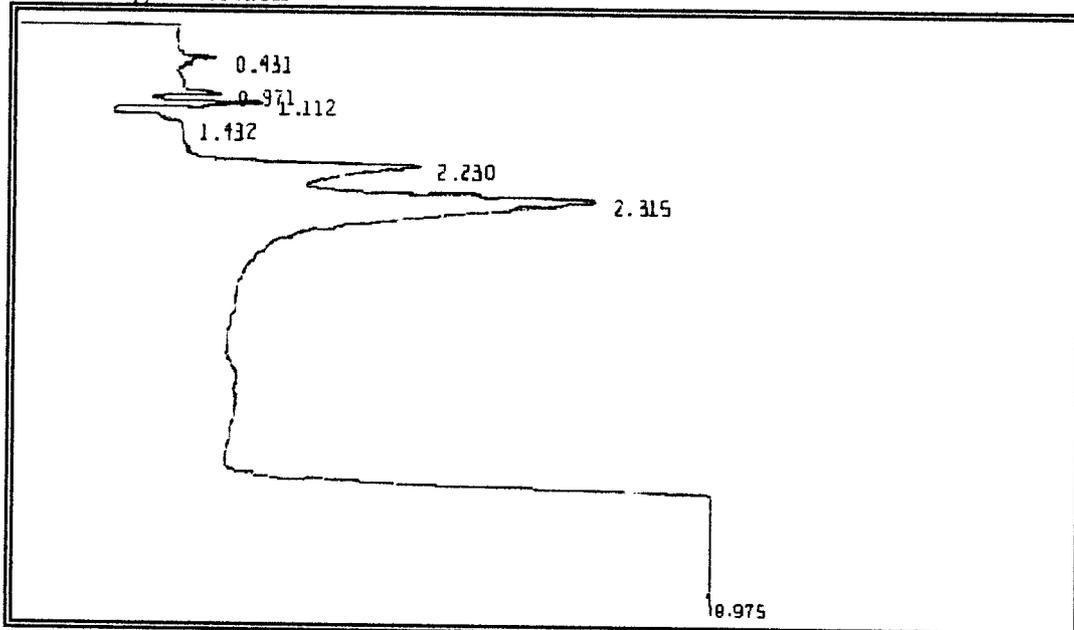
Kromatogram eluen (asetonitril : metanol : akuabides = 3,5 : 1,5 : 4,5)



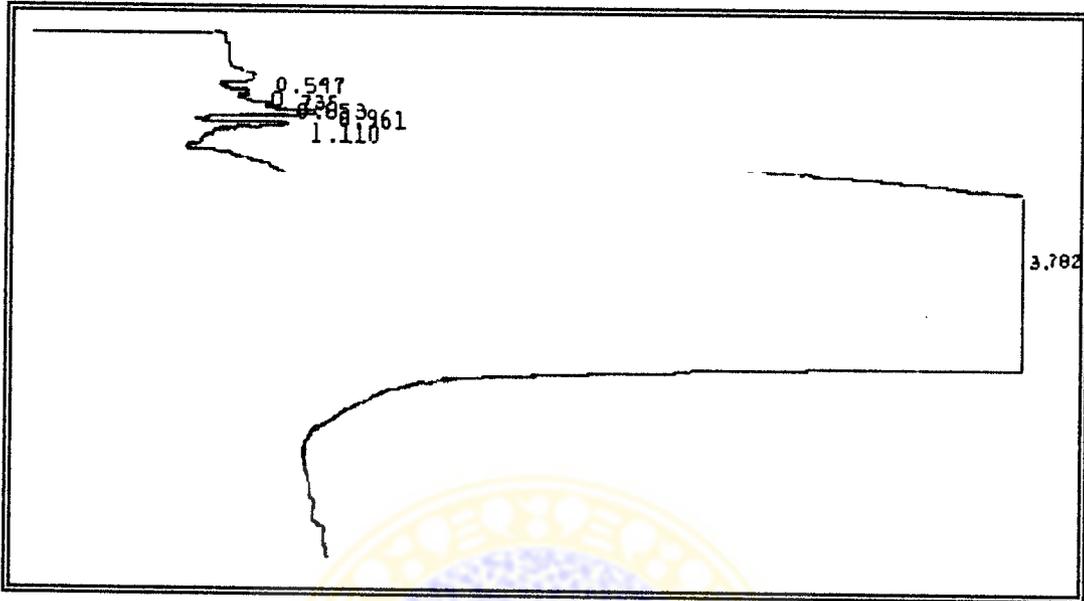
Kromatogram larutan standar etinil estradiol tanpa SDME



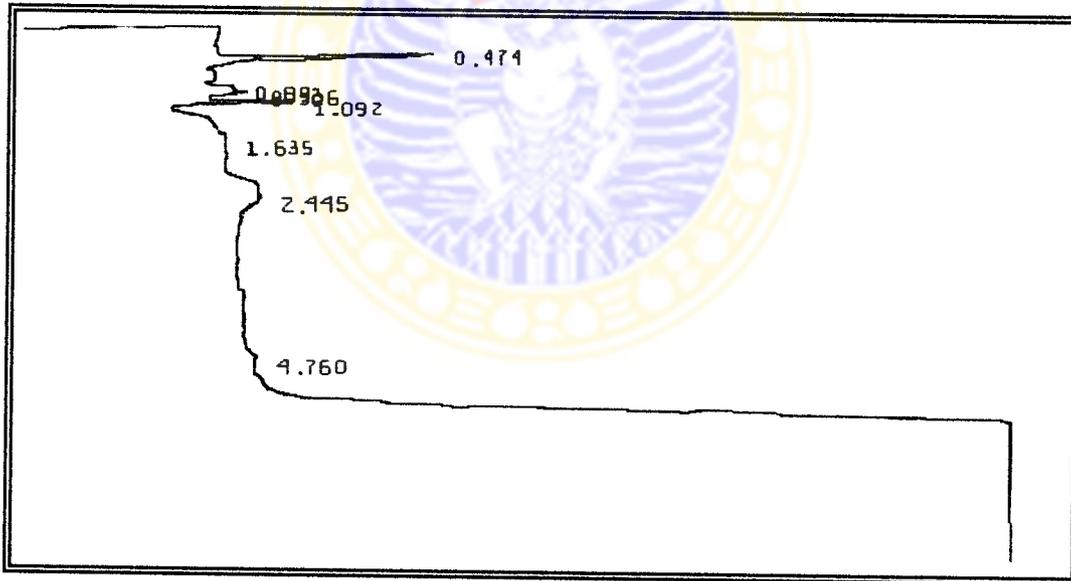
Kromatogram toluen



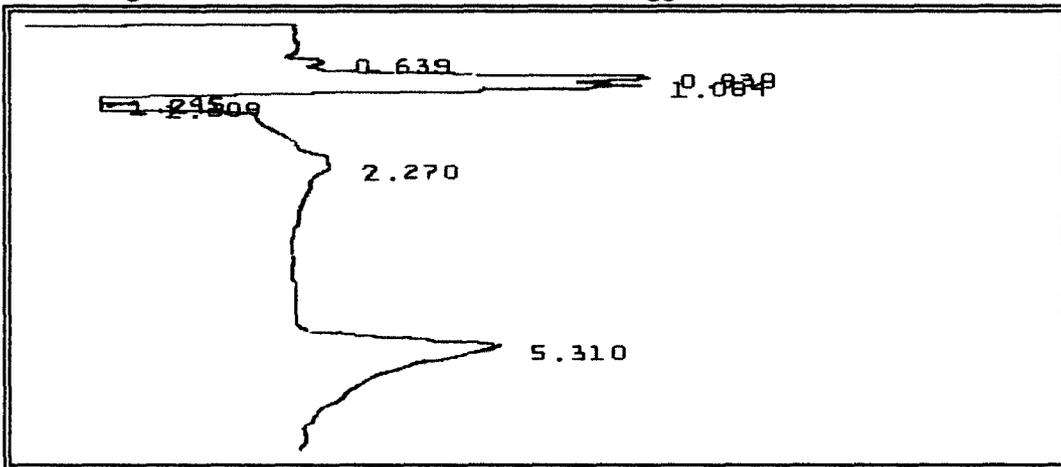
Kromatogram kloroform



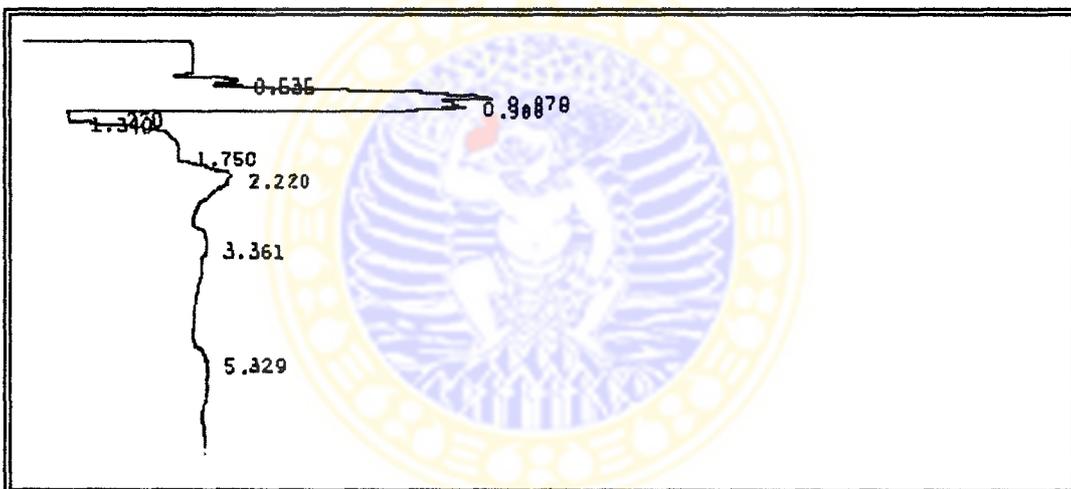
Kromatogram karbon tetraklorida



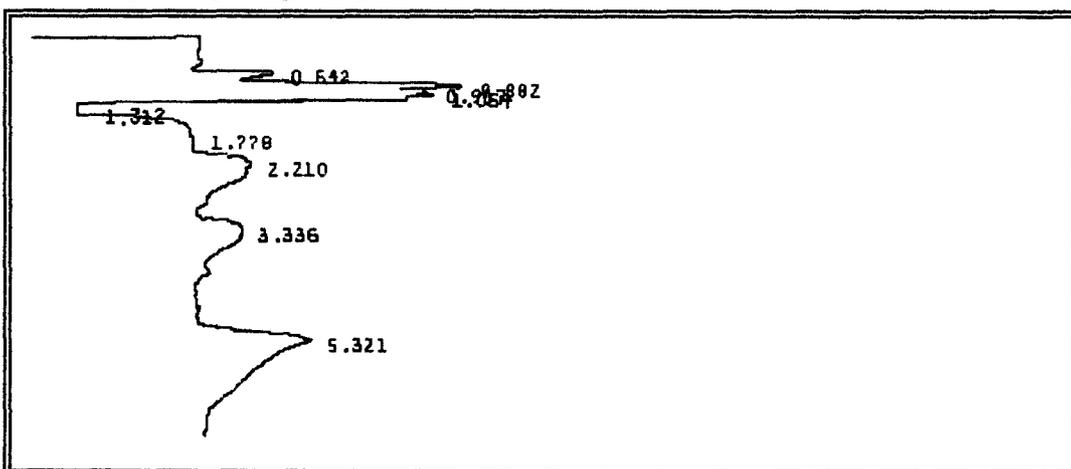
Kromatogram larutan standar etinil estradiol menggunakan SDME



Kromatogram sampel air limbah domestik



Kromatogram spiking sampel



Keterangan :

Parameter integrator yang digunakan :

Zero \_ : 10

CHT SP: 1,0

AR REJ: 0

THRSH: 3

PK WD: 0,05

dengan ketentuan :

zero : batas awal *baseline*

ATT 2^ : pengaturan jarak antar *peak*

CHT SP : kecepatan kertas (1,0 berarti kecepatan kertas 1 cm/menit)

THRSH dan PK WD: kemampuan untuk membaca *peak*

