



**LAPORAN HIBAH PENELITIAN  
PROYEK DUE-LIKE BATCH III**



**Nanoekstraksi Tetesan Mikro Untuk Analisis Pencemar  
Organik Estrogen Sintetik Dalam Limbah Domestik**

Oleh:

**Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si.  
Dra. Miratul Khasanah, M.Si  
Dr. rer. nat. Ganden Supriyanto, M.Sc**

009007141

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
Universitas Airlangga  
Surabaya**

**Desember, 2005**



**LEMBAR PENGESAHAN  
LAPORAN HIBAH PENELITIAN PROYEK DUE-LIKE BATCH III  
PERIODE ANGGARAN 2005**

1. Judul	: Nanoekstraksi Tetesan Mikro Untuk Analisis Pencemar Organik Estrogen Sintetik Dalam Limbah Domestik
2. Penanggung jawab	
a. Nama	: Dra. Usreg Sri Handajani, M.Si
b. NIP	: 131286711
c. Pangkat / Golongan	: Pembina/ IVA
d. Jabatan	: Lektor Kepala
e. Laboratorium	: Kimia Analitik
f. Jurusan	: Kimia
g. Bidang Keahlian	: Kimia Analitik
3. Personalia	
a. Nama	: Dra. Miratul Khasanah, .Si
Bidang Keahlian	: Kimia Analitik
Tugas dalam tim	: Membantu proses analisis dengan HPLC dan interpretasi data
b. Nama	: Dr. rer. nat. Genden Supriyanto, M.Sc.
Bidang Keahlian	: Kimia analitik/ Teknik preparasi sampel
Tugas dalam tim	: Membantu sampling, preparasi sampel, dan analisis dengan HPLC
4. Jangka waktu kegiatan	: delapan bulan
5. Biaya yang diperlukan	: Rp 30.000.000,- (tiga puluh juta rupiah)

Mengotakan  
Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA Unair

Tjitjik Sri Tjahjandarie, Ph.D.  
NIP 131 801 627

Surabaya, Desember 2005  
Penanggung jawab,

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

Menyetujui  
Direktur Eksekutif LPIU DUE-Like  
Universitas Airlangga

Tjitjik Sri Tjahjandarie, Ph.D.  
NIP 131 801 627

## **KATA PENGANTAR**

Kami memanjatkan puji syukur kepada Allah SWT karena dengan rahmat dan hidayah-Nya kami berhasil menyelesaikan penelitian dan laporan penelitian yang didanai oleh Proyek DUE-Like Batch III.

Kami berusaha keras memperoleh dana penelitian ini karena ingin menciptakan atmosfer yang kondusif untuk kegiatan penelitian baik di kalangan staf pengajar maupun di kalangan mahasiswa. Selain itu hasil penelitian ini diharapkan memberikan sumbangan yang berarti bagi perkembangan ilmu pengetahuan di Indonesia. Keharusan untuk melibatkan mahasiswa yang mengambil program skripsi dalam penelitian ini sangat sesuai dengan tujuan kami yaitu membantu mahasiswa yang mempunyai dedikasi yang tinggi untuk mengembangkan ilmu pengetahuan, khususnya bidang kimia, mengoptimalkan potensi diri dan mewujudkan cita-cita mereka menjadi sarjana yang sujana. Dana penelitian ini sangat berguna untuk membantu mahasiswa berprestasi, khususnya yang dari segi ekonomi kurang mampu, untuk berperan serta menghasilkan penelitian-penelitian yang berkualitas.

Dalam kesempatan ini, perkenankan penyusun mengucapkan terima kasih kepada pengelola Proyek DUE-Like yang telah memberikan dana penelitian kompetitif ini. Terima kasih kepada mahasiswa yang terlibat secara aktif dalam penelitian ini dan dapat bekerjasama dengan baik serta mengutamakan team work sehingga penelitian ini dapat diselesaikan sesuai dengan target yang telah direncanakan. Terima kasih juga kami sampaikan kepada pegawai dan analis di jurusan kimia yang membantu kelancaran kegiatan penelitian ini.

Semoga hasil penelitian ini memberikan sumbangan yang berarti bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Surabaya, Desember 2005

Penyusun

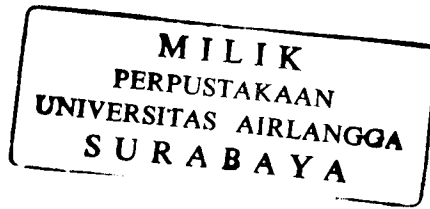
## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang aplikasi ekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik etinilestradiol dalam limbah domestik di daerah Surabaya dan Sidoarjo. Etinilestradiol merupakan estrogen sintetik yang tergolong *endocrine disrupting compounds*. Senyawa ini merupakan salah satu komponen pil kontrasepsi. Lepasnya senyawa ini ke lingkungan memberikan efek yang negatif. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu teknik preparasi sampel yang mempunyai selektivitas dan sensitivitas yang tinggi untuk analisis senyawa ini. Tujuan penelitian ini adalah mengoptimasikan dan menerapkan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, menghasilkan suatu metode preparasi sampel yang lebih sederhana, cepat, murah, selektif, sensitif, dan ramah lingkungan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, mengidentifikasi penyebaran dan konsentrasi senyawa tersebut dalam limbah domestik, dan memberikan informasi kepada instansi terkait tentang penyebaran senyawa-senyawa tersebut di lingkungan untuk digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun kebijakan-kebijakan yang berkaitan dengan permasalahan lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis dan volume pelarut organik, kecepatan pengadukan, dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi. Kondisi optimum ekstraksi tercapai jika menggunakan pelarut toluena dengan volume 3  $\mu$ l, dengan kecepatan pengadukan skala 4 dan waktu ekstraksi 12 menit. Selain itu aplikasi ekstraksi tetesan mikro dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran karena mempunyai limit deteksi yang lebih kecil. Teknik ekstraksi tetesan mikro yang sudah dioptimasi dapat diaplikasikan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik dengan metode spiking dengan recovery 97-103%.

Keywords: ekstraksi tetesan mikro; etinilestradiol; limbah domestik

## DAFTAR ISI

		Halaman
LEMBAR PENGESAHAN		i
KATA PENGANTAR		ii
ABSTRAK		iii
DAFTAR ISI		iv
DAFTAR TABEL		vi
DAFTAR GAMBAR		vii
BAB I	PENDAHULUAN	1
	1.1. Latar Belakang Masalah	1
	1.2. Rumusan Masalah Penelitian	4
BAB II	TUJUAN PENELITIAN	5
BAB III	TINJAUAN PUSTAKA	6
	3.1. Teknik Preparasi Sampel	6
	3.2. Ekstraksi	6
	3.2.1. Klasifikasi Ekstraksi	6
	3.2.2. Ekstraksi Tetesan Mikro	7
	3.2.2.1. Teori ekstraksi tetesan mikro	10
	3.2.2.2. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap ekstraksi tetesan mikro	12
	3.2.2.3. Aplikasi ekstraksi tetesan mikro	14
	3.3. Etinilestradiol	18
BAB IV	METODE PENELITIAN	21
	4.1. Waktu dan Tempat Penelitian	21
	4.2. Bahan dan Alat Penelitian	21
	4.3. Jenis dan Lokasi Pengambilan Sampel	21
	4.4. Teknik Preservasi Sampel	22
	4.5. Pembuatan Larutan	22
	4.5.1. Pembuatan Larutan Standar Etinilestradiol	22
	4.5.2. Pembuatan Eluen	22
	4.6. Penyiapan Instrumentasi HPLC	22
	4.7. Analisis Larutan Standar Etinilestradiol Tanpa Ekstraksi Tetesan Mikro	23



4.8. Optimasi Parameter-parameter Analitik	23
4.8.1. Pengaruh Jenis Pelarut Organik	23
4.8.2. Pengaruh Volume Pelarut Organik	24
4.8.3. Pengaruh Kecepatan Pengadukan	24
4.8.4. Pengaruh Waktu Ekstraksi	24
4.9. Pembuatan Kurva Standar Etinilestradiol	24
4.10. Analisis Etinilestradiol dalam Limbah Domestik	24
4.11. Penentuan Recovery	25
4.12. Skema Kerja	25
<b>BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b>	<b>26</b>
5.1. Penyiapan dan Optimasi Instrumentasi HPLC	26
5.2. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Etinilestradiol Tanpa Ekstraksi Tetesan Mikro	28
5.3. Optimasi Kondisi Ekstraksi	30
5.4. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Etinilestradiol dengan Ekstraksi Tetesan Mikro	34
5.5. Analisis Etinilestradiol dalam Limbah Domestik	36
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>38</b>
6.1. Kesimpulan	38
6.2. Saran	38
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN</b>	<b>41</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 5.1 Data luas area larutan standar etinilestradiol tanpa ekstraksi tetesan mikro	29
Tabel 5.2 Hubungan antara waktu ekstraksi dan luas peak area pelarut organik	31
Tabel 5.3 Pengaruh volume pelarut organik terhadap luas peak	32
Tabel 5.4 Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap efisiensi Ekstraksi	34
Tabel 5.5 Data luas area larutan standar etinilestradiol dengan ekstraksi tetesan mikro	35
Tabel 5.6 Perbandingan parameter analitik antara ekstraksi tetesan mikro dengan teknik tanpa ekstraksi	36



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 3.1 Tahapan pada proses analisis	6
Gambar 3.2 Klasifikasi teknik ekstraksi	7
Gambar 3.3 Skema ekstraksi tetesan mikro sistim <i>batch</i> dan kontinyu	8
Gambar 3.4 Skema ekstraksi tetesan mikro sistem <i>immersion</i> dan <i>head space</i>	9
Gambar 3.5 Struktur etinilestradiol	18
Gambar 4.1 Skema kerja analisis etinilestradiol dalam limbah domestik	25
Gambar 5.1 Kurva kalibrasi etinilestradiol tanpa ekstraksi tetesan mikro	29
Gambar 5.2. Hubungan antara waktu ekstraksi dan luas peak pelarut organik	32
Gambar 5.3. Pengaruh volume pelarut organik terhadap luas peak	33
Gambar 5.4 Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap kecepatan Pengadukan	34
Gambar 5.5. Kurva kaibrasi larutan standar etinilestradiol dengan ekstraksi tetesan mikro	35





## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Ancaman pencemaran yang disebabkan oleh limbah domestik semakin meningkat seiring dengan meningkatnya pertumbuhan penduduk yang sangat pesat. Ironisnya keadaan ini tidak pernah disadari oleh masyarakat karena kurangnya informasi mengenai jenis-jenis pencemar dan akibat yang dapat ditimbulkannya jika lepas ke lingkungan kepada masyarakat. Hal ini diperparah dengan tidak tersedianya instalasi pengolahan limbah domestik sehingga bahan-bahan pencemar akan lepas ke lingkungan tanpa adanya proses pengolahan limbah. Salah satu bahan pencemar berbahaya tersebut adalah estrogen sintetik.

Estrogen sintetik termasuk senyawa golongan pengganggu fungsi endokrin (*endocrine disrupting compounds* (EDCs)) yang mendapatkan perhatian yang sangat luas dari peneliti dan pemerhati lingkungan karena efeknya yang membahayakan kesehatan. Salah satu golongan estrogen sintetik adalah etinilestradiol. Etinilestradiol telah digunakan secara luas dalam pil kontraseptik. Kelebihan senyawa tersebut dalam tubuh akan dikeluarkan melalui urin dan masuk ke lingkungan karena tidak adanya instalasi pengolahan limbah domestik. Meningkatnya konsentrasi senyawa-senyawa tersebut di perairan dan sedimen diduga sebagai penyebab timbulnya feminisasi pada ikan.

Baku mutu standar senyawa-senyawa tersebut yang dikeluarkan oleh Badan Pengendalian Dampak Lingkungan Daerah Tingkat I Propinsi Jawa Timur berada dalam tingkat konsentrasi yang sangat rendah. Selain itu senyawa-senyawa tersebut biasanya berada dalam matriks yang sangat kompleks. Oleh karena itu diperlukan instrumen-instrumen analisis yang memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi. Ironisnya banyak laboratorium yang digunakan sebagai rujukan untuk analisis rutin senyawa tersebut tidak dilengkapi dengan instrumen-instrumen analisis yang memadai karena mahalnya harga instrumen-instrumen analisis tersebut.

Rendahnya konsentrasi senyawa-senyawa tersebut di lingkungan, rendahnya nilai standar baku mutu untuk senyawa-senyawa tersebut yang membutuhkan limit

deteksi lebih rendah dari 0,1 ng/L, dan keberadaan senyawa-senyawa tersebut dalam matriks yang kompleks merupakan tantangan dalam bidang kimia analisis karena terbatasnya instrumen analisis yang mampu mendeteksi senyawa-senyawa tersebut dalam konsentrasi yang sangat rendah (nanoanalisis). Oleh karena itu diperlukan suatu teknik preparasi sampel yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa target dari matriks dan memekatkannya sehingga dengan konsentrasi yang sangat rendah masih dapat dianalisis menggunakan instrumen analisis yang bersensitifitas rendah yang tersedia.

Analisis senyawa-senyawa tersebut dalam matriks biasanya diawali dengan proses ekstraksi konvensional yang berakibat pada rumitnya proses ekstraksi, pelarut organik yang digunakan sangat banyak, dan waktu ekstraksinya lama, yang berakibat pada tingginya resiko pencemaran lingkungan akibat limbah yang dihasilkan dan tingginya biaya operasional untuk analisis (misalnya biaya pengadaan zat kimia, baik berupa pelarut organik maupun reagen/pereaksi).

Beberapa peneliti telah melaporkan metode penentuan kadar etinilestradiol yang diawali dengan proses ekstraksi untuk preparasi sampelnya, seperti ekstraksi fasa padat (*solid phase extraction*) dan penggunaan membran hollow fiber yang dilanjutkan dengan analisis menggunakan GC dan HPLC dengan berbagai macam detektor (Jurgens, 1999). Namun demikian, metode-metode ini menghabiskan banyak waktu, instrumen analisisnya sangat mahal, dan persen recoverynya sangat rendah (33.8%).

Teknik preparasi sampel yang sering digunakan adalah ekstraksi cair-cair. Teknik ekstraksi cair-cair konvensional biasanya dilakukan dengan menggunakan labu pemisah (*separatory funnel*). Metode ini mempunyai beberapa kelemahan, diantaranya adalah timbulnya emulsi, tingginya konsumsi pelarut organik yang dibutuhkan, menghasilkan limbah pelarut organik dalam jumlah yang besar, proses ekstraksinya membutuhkan waktu yang lama, dan tidak dapat dilakukan secara otomatis. Sementara itu teknik-teknik ekstraksi yang lain seperti ekstraksi fasa padat (*solid phase extraction*), dan ekstraksi fasa padat mikro (*solid phase microextraction*), masih sulit diterapkan untuk analisis rutin karena membutuhkan instrumen analisis yang canggih dan mahal, prosesnya rumit, dan material yang digunakan untuk ekstraksi tidak dapat didaur ulang.

Sementara itu informasi yang berisi data base tentang penyebaran dan konsentrasi senyawa tersebut di lingkungan belum ada. Padahal informasi tersebut sangat penting untuk digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun kebijakan-kebijakan yang berkaitan dengan permasalahan lingkungan.

Hasil penelusuran pustaka menunjukkan bahwa ekstraksi tetesan mikro sangat efektif digunakan untuk ekstraksi, pemisahan, dan pemekatan senyawa-senyawa organik. Derajat pemekatannya dapat diatur berdasarkan perbandingan antara volume sampel dan volume pelarut organik. Dengan derajat pemekatan yang tinggi ini maka instrumen-instrumen analisis yang bersensitivitas rendah masih dapat digunakan untuk analisis senyawa tersebut dengan limit deteksi yang sangat rendah (dalam kisaran ng/L). Selain itu volume sampel dan pelarut organik yang digunakan sangat sedikit (dalam kisaran mikroliter) dan limbah yang dihasilkan dari proses analisis juga sedikit sehingga biaya analisisnya menjadi murah dan resiko pencemaran oleh limbah yang dihasilkan dari proses analisis tersebut menjadi rendah. Berdasarkan penelusuran pustaka belum ada peneliti yang menerapkan ekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetis dalam limbah domestik. Oleh karena itu penelitian ini sangatlah penting untuk dilakukan karena keluaran penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk menyelesaikan permasalahan-permasalahan tersebut diatas khususnya untuk menghasilkan suatu metode preparasi sampel yang lebih sederhana, cepat, murah, selektif, sensitif, dan ramah lingkungan untuk analisis estrogen sintetis dalam air limbah domestik.

Dalam penelitian ini parameter-parameter penelitian yang meliputi kondisi ekstraksi (pengaruh jenis dan volume pelarut organik, lama dan kecepatan pengadukan) dan parameter-parameter analitik (akurasi, presisi, linearitas, limit deteksi, dan limit kuantitasi) telah dioptimasi. Kemudian kondisi optimumnya digunakan untuk analisis etinilestradiol dalam air limbah domestik.

## 1.2. Rumusan Masalah Penelitian

Berdasarkan latar belakang di atas, maka masalah penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Apakah teknik ekstraksi tetesan mikro dapat digunakan sebagai tahap preparasi sampel pada penentuan kadar etinilestradiol?
- b. Apakah teknik ekstraksi tetesan mikro dapat diaplikasikan untuk penentuan kadar etinilestradiol dalam limbah domestik?
- c. Bagaimanakah penyebaran etinilestradiol dalam limbah domestik di daerah Surabaya ?

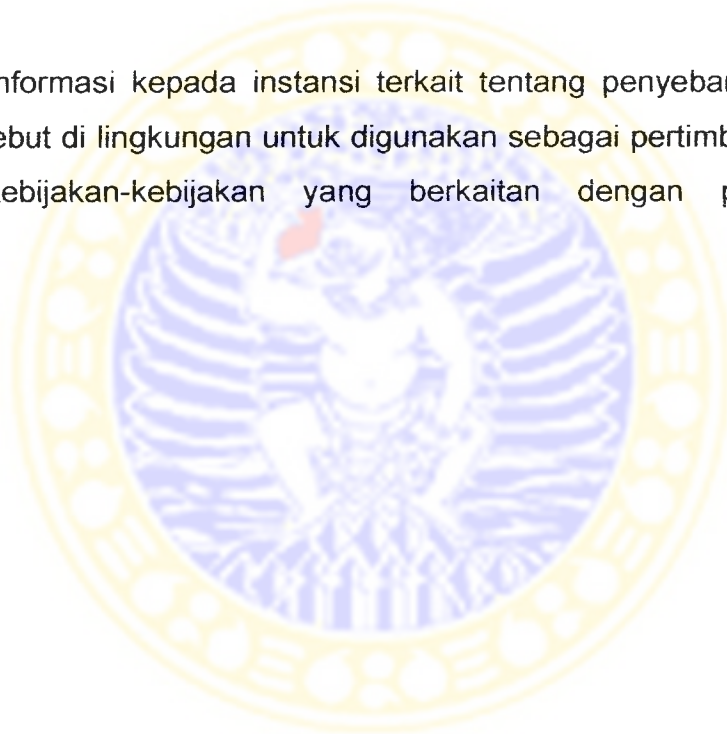


## **BAB II**

### **TUJUAN PENELITIAN**

Tujuan penelitian ini adalah:

1. mengoptimasikan dan menerapkan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik;
2. menghasilkan suatu metode preparasi sampel yang lebih sederhana, cepat, murah, selektif, sensitif, dan ramah lingkungan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik;
3. mengidentifikasi penyebaran dan konsentrasi senyawa tersebut dalam limbah domestik;
4. memberikan informasi kepada instansi terkait tentang penyebaran senyawa-senyawa tersebut di lingkungan untuk digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun kebijakan-kebijakan yang berkaitan dengan permasalahan lingkungan.

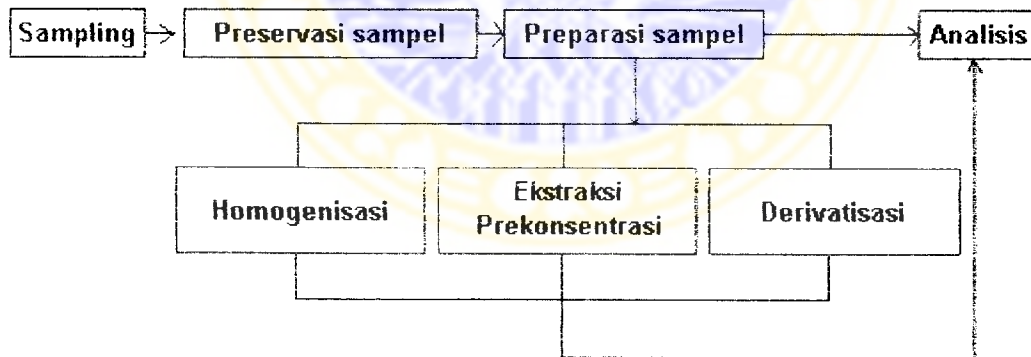


## BAB III

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 3.1. Teknik Preparasi Sampel

Teknik-teknik analisis sampel telah berkembang dengan pesat sejak beberapa dekade. Instrumentasi analisis seperti kromatografi, spektroskopi dan mikroskopi serta sensor dan alat-alat mikroanalisis telah berkembang dengan pesat. Walaupun instrumen analisis yang dikembangkan sampai saat ini sangat kompleks dan canggih, pengukuran sampel seringkali belum dapat dilakukan secara langsung. Dengan kata lain, tahap pretreatment masih sangat penting yang dikenal sebagai tahap preparasi sampel yang bertujuan untuk memekatkan, clean up, and meningkatkan sensitivitas pengukuran. Preparasi sampel merupakan tahap yang sangat penting dalam proses analisis. Tahap ini umumnya membutuhkan waktu yang sangat lama. Sayang sekali teknik preparasi sampel belum mendapat perhatian yang memadai sebelum berkembangnya industri sejak dua dekade terakhir, khususnya industri farmasi dan industri-industri yang berkaitan dengan lingkungan yang sangat membutuhkan teknik preparasi sampel yang handal karena banyaknya sampel yang harus dianalisis. Kedudukan preparasi sampel dalam proses analisis ditunjukkan pada gambar 3.1.



Gambar 3.1 Tahapan pada proses analisis

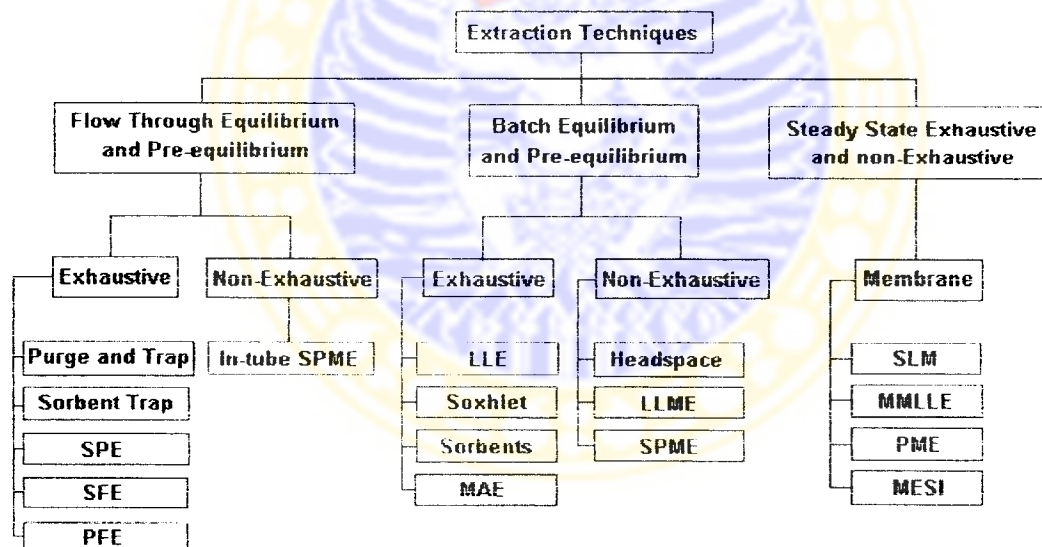
#### 3.2. Ekstraksi

##### 3.2.1 Klasifikasi Ekstraksi

Teknik preparasi sampel dalam proses analisis umumnya terdiri dari homogenisasi, ekstraksi, dan derivatisasi yang bertujuan untuk mengisolasi senyawa target dalam sampel dari matrik yang sangat kompleks dan

memekatkannya. Ekstraksi sangat bervariasi pada tingkat selektifitas, kecepatan, dan keandalannya dan tidak hanya tergantung pada pendekatan-pendekatan dan kondisi yang digunakan tetapi juga tergantung pada konfigurasi fasa-fasa ekstraksi.

Teknik ini semakin mendapatkan perhatian yang lebih luas sejak ditemukannya teknologi ekstraksi non tradisional. Teknologi ini memberikan beberapa keuntungan karena penggunaan pelarut organik dapat diminimalkan, dapat dilakukan secara otomatis, dapat dibuat dalam skala yang sangat kecil (miniatur) dan dapat diaplikasikan secara in situ maupun in vivo. Namun demikian, walaupun teknik-teknik ini mudah untuk dioperasikan, tahapan optimasinya juga harus dilakukan. Optimasi dari proses ekstraksi akan meningkatkan kinerja proses analisis secara keseluruhan. Desain yang benar pada alat-alat yang digunakan untuk proses ekstraksi dan penggunaan prosedur ekstraksi yang benar akan menghasilkan suatu teknik yang handal. Klasifikasi ekstraksi secara umum ditunjukkan pada gambar 3.2.



SPE = Solid Phase Extraction; SFE = Supercritical Fluid Extraction; PFE = Pressurized Fluid Extraction; SPME = Solid Phase Microextraction; LLE = Liquid Liquid Extraction ; MAE = Microwave Assisted Extraction; LLME = Liquid Liquid Microextraction; SLM = Supported Liquid Membrane extraction; MMLLE = Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction; PME = Polymeric Membrane Extraction; MESI = Membrane Extraction with Sorbent Interface

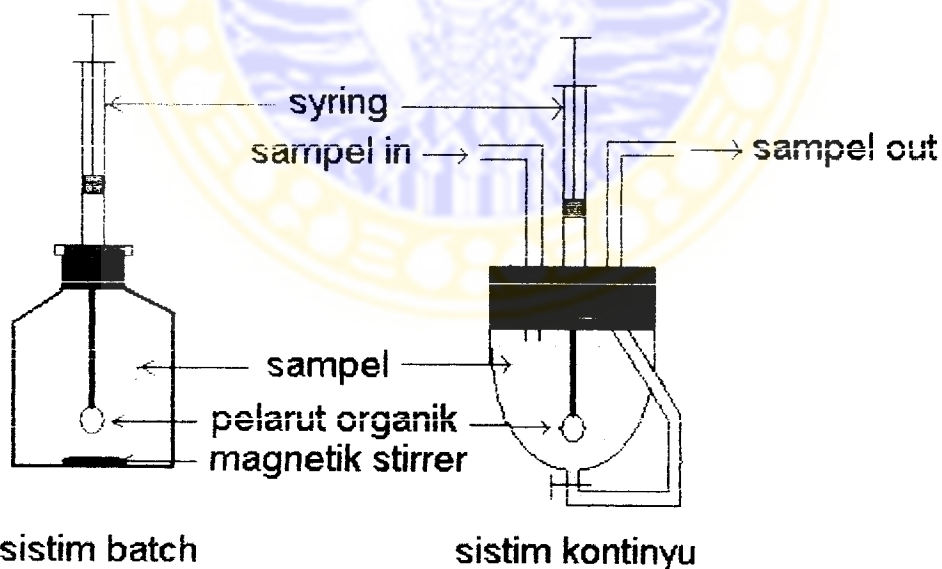
Gambar 3.2 Klasifikasi teknik ekstraksi

### 3.2.2 Ekstraksi Tetesan Mikro

Ekstraksi tetesan mikro adalah teknik ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut organik dalam jumlah sangat sedikit (dalam kisaran mikroliter) yang

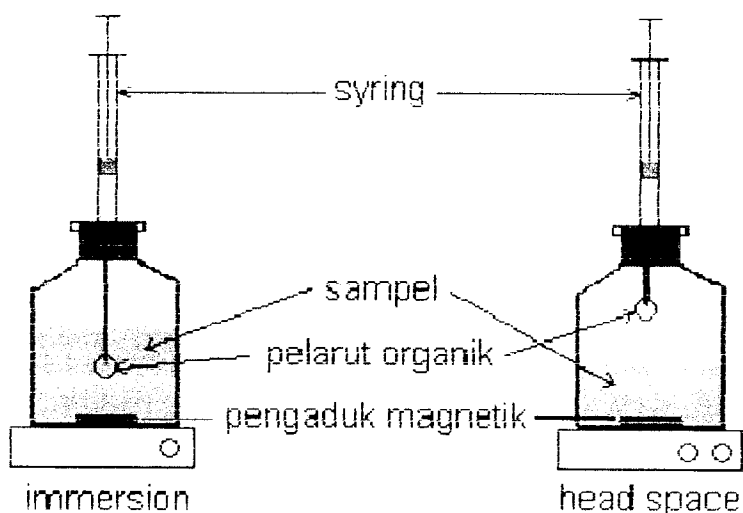
dibiarkan menggantung di ujung jarum syring dan diletakkan di dalam larutan sampel. Larutan sampel selalu diaduk dengan bantuan pengaduk magnetik supaya transfer massa senyawa target ke pelarut organik berlangsung sempurna (Liu dan Dasgupta, 1996).

Berdasarkan jenis aliran larutan sampel, ekstraksi senyawa target dengan teknik ini dapat dilakukan dengan dua cara yaitu sistem *batch* dan sistem kontinyu. Dalam sistem *batch* sejumlah volume pelarut organik di ujung syring dimasukkan ke dalam sejumlah volume sampel. Kemudian larutan sampel diaduk terus-menerus dengan menggunakan pengaduk magnetik. Setelah proses ekstraksi maka pelarut organiknya ditarik kembali ke dalam syring dan diinjeksikan langsung ke instrumen analisis (HPLC atau GC). Sedangkan dalam sistem kontinyu pelarut organik di ujung syring diletakkan dalam suatu mikro reaktor yang dialiri sampel sehingga proses ekstraksi terjadi secara kontinyu. Dengan cara yang sama pelarut organiknya ditarik kembali ke dalam syring dan diinjeksikan langsung ke instrumen analisis (HPLC atau GC). Jika Skema ekstraksi tetesan mikro secara *batch* dan kontinyu ditunjukkan oleh gambar 3.3.



Gambar 3.3 Skema ekstraksi tetesan mikro sistim *batch* dan kontinyu





Gambar 3.4 Skema ekstraksi tetesan mikro sistem *immersion* dan *head space*

Berdasarkan posisi tetesan mikro pelarut organiknya, ekstraksi senyawa target dengan teknik ini dapat dilakukan dengan dua cara yaitu sistem *immersion* dan sistem *head space*. Dalam sistem *immersion* sejumlah volume pelarut organik di ujung syring dimasukkan ke dalam sejumlah volume sampel. Kemudian larutan sampel diaduk terus-menerus dengan menggunakan pengaduk magnetik. Setelah proses ekstraksi maka pelarut organiknya ditarik kembali ke dalam syring dan diinjeksikan langsung ke instrumen analisis (HPLC atau GC). Sedangkan dalam sistem *head space* pelarut organik di ujung syring diletakkan di atas larutan sampel sehingga tetesan pelarut organik tidak kontak secara langsung dengan larutan sampel. Dengan cara yang sama pelarut organiknya ditarik kembali ke dalam syring dan diinjeksikan langsung ke instrumen analisis (HPLC atau GC). Sistem *immersion* biasanya digunakan untuk ekstraksi analit yang tidak mudah menguap (*non volatil*), sedangkan sistem *head space* digunakan untuk ekstraksi analit yang mudah menguap (*volatil*).

Selama proses ekstraksi, transfer massa analit terjadi secara dinamik dari larutan sampel ke pelarut organik yang sangat dipengaruhi oleh koefisien distribusi analit. Faktor-faktor lain yang berpengaruh diantaranya adalah volume sampel, jenis dan volume pelarut organik, kecepatan pengadukan, pH larutan sampel, dan kecepatan laju alir sampel (untuk sistem kontinyu). Jika semua analit terekstraksi secara sempurna ke dalam pelarut organik maka akan terjadi

pemekatan. Derajat pemekatan teoritis adalah perbandingan antara volume sampel dan volume pelarut organik.

### 3.2.2.1. Teori ekstraksi tetesan mikro

Proses mikroekstraksi dipicu oleh adanya perbedaan konsentrasi analit antara dua fasa yang saling tidak bercampur (fasa cair dan fasa organik). Transfer massa dari analit dari fasa cair ke fasa organik akan berlangsung terus-menerus sampai kesetimbangan dinamikinya tercapai atau jika proses ekstraksinya dihentikan setelah waktu tertentu.

Setelah kesetimbangan, maka banyaknya analit yang terdistribusi di dalam kedua fasa seharusnya sama dengan jumlah analit mula-mula yang terdapat dalam fasa cair seperti dituliskan dalam persamaan:

$$C_A^{aq}V^{aq} + C_A^oV^o = C_{A,O}^{aq}V^{aq} \dots\dots\dots 3.1$$

dengan ketentuan  $C_A^{aq}$  dan  $C_A^o$  adalah konsentrasi analit dalam sampel dan dalam fasa organik.  $V^{aq}$  dan  $V^o$  adalah volume sampel dan volume pelarut organik (fasa organik). Sedangkan  $C_{A,O}^{aq}$  adalah konsentrasi analit mula-mula dalam sampel. Kesetimbangan massa analit di dalam pelarut organik dirumuskan sebagai berikut: (Jeannot dan Cantwell, 1996)

$$\frac{d(C_A^oV^o)}{dt} = k_{tot}^o A_i [K_A C_A^{aq} - C_A^o] \dots\dots\dots 3.2$$

dengan ketentuan  $A_i$  adalah luas area dari tetesan pelarut organik yang setara dengan  $(V^o)^{2/3}$ ,  $K_A$  adalah koefisien partisi kesetimbangan dan  $k_{tot}^o$  adalah koefisien transfer massa total analit. Dalam teori dua film  $k_{tot}^o$  dirumuskan sebagai:

$$\frac{1}{k_{tot}^o} = \frac{1}{k^o} + \frac{K_A}{k^{aq}} \dots\dots\dots 3.3$$

dengan  $k^o$  dan  $k^{aq}$  adalah koefisien transfer massa untuk analit di dalam lapisan film pelarut organik dan fasa cair.

Dengan mengasumsikan bahwa volume dari pelarut organik tetap maka nilai  $A_i$  juga tetap. Kombinasi antara persamaan 3.1 dan 3.2 akan menghasilkan persamaan:

$$C_A^o(t) = C_A^{o,eq}[1 - e^{-\lambda t}] \dots\dots\dots 3.4$$

dengan ketentuan  $C_A^{o,eq}$  adalah konsentrasi analit dalam pelarut organik pada kesetimbangan dan  $\lambda$  adalah konstanta kecepatan yang keduanya dirumuskan sebagai berikut:

$$C_A^{o,eq} = \frac{K_A C_{A,O}^{aq} V^{aq}}{V^{aq} + K_A V^o} \dots\dots\dots 3.5$$

$$\lambda = \frac{k_{tot}^o A_i (1 + \frac{K_A V^o}{V^{aq}})}{V^o} \dots\dots\dots 3.6$$

Persamaan 3.6 menunjukkan parameter-parameter yang mempengaruhi waktu yang dibutuhkan untuk ekstraksi. Dengan menggunakan model sederhana di atas maka dapat ditunjukkan bahwa jika nilai  $k_{tot}^o$  diperbesar sementara nilai  $V^o$  dan  $V^{aq}$  diperkecil menghasilkan proses ekstraksi yang lebih cepat.

Maksimalisasi nilai  $k_{tot}^o$  dapat dilakukan dengan cara memperbesar nilai  $k^{aq}$  dimana nilai  $k^o$  seringkali jauh lebih besar dibandingkan dengan nilai  $k^{aq}$ . Koefisien transfer massa,  $k^{aq}$ , berhubungan dengan difusifitas analit dalam fasa cair ( $D_A^{aq}$ ) dan ketebalan konstan film ( $\delta$ ) di sekitar tetesan pelarut organik, yang dikenal juga sebagai difusi film Nernst.

$$k^{aq} = \frac{D_A^{aq}}{\delta} \dots\dots\dots 3.7$$

Pendekatan model di atas dilakukan dengan mengasumsikan bahwa volume tetesan pelarut organik tidak berubah selama proses ekstraksi. Tetapi

kenyataannya, selama proses ekstraksi sebagian pelarut organik akan larut. Bahkan seringkali volumenya tinggal setengahnya setelah 30 menit proses ekstraksi. Pelarut organik mula-mula hanya terdapat pada tetesan mikro yang akhirnya sebagian terdistribusi diantara dua fasa.

$$C_s^{aq}V^{aq} + \rho_s V_0 = \rho_s V_0^0 \dots\dots\dots 3.8$$

dengan ketentuan  $\rho_s$  adalah densitas pelarut organik,  $C_s^{aq}$  adalah konsentrasi pelarut organik dalam fasa cair dan  $V_0^0$  adalah volume pelarut organik mula-mula. Sehingga kesetimbangan massa dinamik dari pelarut organik dapat dinyatakan sebagai:

$$\rho_s \frac{dV_0}{dt} = -V^{aq} \frac{dC_s^{aq}}{dt} = -k_s A_i [C_s^{aq,eq} - C_s^{aq}] \dots\dots\dots 3.9$$

dengan ketentuan  $k_s$  adalah koefisien transfer massa dari pelarut organik dalam film fasa cair dan  $C_s^{aq,eq}$  adalah konsentrasi kesetimbangan pelarut organik dalam fasa cair (kelarutan pelarut organik dalam fasa cair). Nilai  $k_s$  dapat diperoleh secara eksperimen tanpa menggunakan analit selama karakteristik agitasi dijaga konstan. Kombinasi antara persamaan 3.2 dan 3.9 menghasilkan persamaan:

$$\frac{dC_A^0}{dt} = \frac{k_{tot}^0 A_i [K_A C_A^{aq} - C_A^0]}{V_0^0} + \frac{k_s A_i C_A^0 [C_s^{aq,eq} - C_s^{aq}]}{V_0^0 \rho_s} \dots\dots\dots 3.10$$

Persamaan 3.10 memberikan estimasi yang lebih baik tentang dinamik dari mikroekstraksi.

### 3.2.2.2. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap ekstraksi tetesan mikro

#### *Penambahan garam*

Penambahan garam pada sampel dapat mempengaruhi efisiensi ekstraksi analit karena dapat meningkatkan kekuatan ionik larutan. Tergantung pada kelarutan analit, efisiensi ekstraksi umumnya meningkat dengan meningkatnya konsentrasi garam dalam larutan dan polaritas dari analit (*salting out effect*).

Namun demikian, fakta yang berlawanan dapat juga terjadi dalam ekstraksi tetesan mikro untuk beberapa jenis senyawa seperti klorobenzena (Wang et al., 1998) dan sebagian besar bahan peledak golongan nitroamin (Psillakis dan Kalogerakis, 2001). Telah diasumsikan bahwa selain *salting out effect*, adanya garam dalam sampel menyebabkan *second effect* dan mengubah sifat fisik dari film ekstraksi. Hal ini dapat menurunkan kecepatan difusi analit ke dalam tetesan mikro.

### *pH*

pH larutan sampel akan mempengaruhi efisiensi ekstraksi jika analitnya berupa senyawa asam atau basa. Pada proses mikro ekstraksi, pengaturan pH yang menyebabkan analit berifat netral dapat meningkatkan efisiensi ekstraksinya. Oleh karena larutan bufer harus digunakan untuk meningkatkan reproduibilitas pengukuran. Selain itu filtrasi sampel perlu dilakukan untuk mencegah terjadinya pelepasan tetesan mikro karena bertabrakan dengan partikel-partikel yang tidak larut yang terdapat dalam sampel (de Jager dan Andrews, 2001).

### *Pengadukan sampel*

Pengadukan sampel selama proses ekstraksi dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi dan mempersingkat waktu untuk mencapai kesetimbangan termodinamik. Penggunaan pengaduk magnetik pada proses ekstraksi tetesan mikro dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi secara signifikan yang ditunjukkan dengan meningkatnya signal instrumen analisis pada semua kasus. Namun demikian, ada batasan tertentu pada kecepatan pengadukan sehingga tetesan mikro tidak lepas dari jarum syring atau tidak larut dalam fasa cair khususnya jika dibutuhkan waktu yang lama untuk proses ekstraksinya (Jeannot dan Cantwell, 1996; de Jager dan Andrews, 2001). Penggunaan pengaduk magnetik yang kecil, kecepatan pengadukan yang konstan, dan pengaturan temperatur yang konstan sangat diperlukan untuk menghasilkan data dengan presisi yang baik (de Jager dan Andrews, 1999).

### *Jenis pelarut organik*

Pemilihan jenis pelarut organik yang tepat merupakan faktor yang sangat penting dalam proses ekstraksi, khususnya ekstraksi tetesan mikro. Prinsip *like dissolves like* dapat digunakan untuk menentukan pelarut organik yang sesuai. Penentuan jenis pelarut organik harus didasarkan pada parameter selektifitas, efisiensi ekstraksi, kemungkinan hilangnya tetesan mikro, kecepatan pelarutan pelarut organik dalam fasa cair dan toksisitas dari pelarut organik tersebut.

### *Waktu ekstraksi*

Ekstraksi tetesan mikro bukanlah jenis ekstraksi total. Walaupun signal pengukuran yang maksimum dapat dicapai jika ekstraksinya mencapai kesetimbangan, pengukuran sampel tidak harus dilakukan setelah tercapainya kesetimbangan untuk memperoleh hasil yang mempunyai presisi dan akurasi yang baik. Waktu ekstraksi yang terlalu lama justru dapat menyebabkan pelarutan pelarut organik ke dalam fasa cair dan resiko lepasnya tetesan mikro dari jarum syring. Waktu ekstraksi biasanya disesuaikan dengan waktu yang dibutuhkan untuk analisis satu sampel menggunakan teknik kromatografi sehingga proses analisis menjadi efisien (Psillakis dan Karogelakis, 2001). Jika waktu ekstraksi yang dipilih adalah waktu sebelum kesetimbangan, maka penentuan waktunya harus sama antara sampel yang satu dengan sampel yang lain supaya presisi pengukurannya baik (He dan Lee, 1997).

### *Volume pelarut organik*

Penggunaan volume pelarut organik yang lebih besar umumnya memperbesar efisiensi ekstraksi. Tetapi volume tetesan yang lebih besar mempunyai beberapa kelemahan diantaranya adalah tidak stabil, mudah lepas, dan menyebabkan pelebaran peak pada analisis menggunakan GC.

#### 3.2.2.3. Aplikasi ekstraksi tetesan mikro

Liu dan Dasgupta (1996) adalah peneliti pertama yang melaporkan penggunaan ekstraksi tetesan mikro. Mereka menggunakan teknik ini untuk menentukan kadar senyawa kompleks yang terbentuk karena reaksi antara metilen biru dan natrium lauril sulfat dengan cara mengekstraksi senyawa

kompleks tersebut dengan 1.3  $\mu$ l pelarut organik (kloroform) yang diletakkan pada ujung jarum sebuah syring. Kemudian dalam waktu yang bersamaan, Jeannot dan Cantwell (1996) memperkenalkan suatu teknik ekstraksi pelarut mikro dengan cara meletakkan sejumlah volume pelarut organik (8  $\mu$ l) yang mengandung internal standar pada ujung pipa kapiler yang terbuat dari teflon. Kemudian pipa kapiler ini dicelupkan ke dalam larutan sampel yang mengandung 4-metilasetofenon. Setelah beberapa menit, pipa kapiler diangkat dan dengan bantuan mikro syring, larutan sampel diambil dan diinjeksikan ke gas kromatografi. Namun demikian, penggunaan pipa kapiler dari teflon dianggap tidak efektif dan peneliti lebih suka menggunakan teknik tetesan mikro.

Teknik ini kemudian digunakan untuk menentukan kadar malathion, 4-metilasetofenon, 4-nitro-toluena dan progesteron menggunakan 1  $\mu$ l pelarut organik (Jeannot dan Cantwell, 1997). Selanjutnya, Jeannot dan Cantwell (1997) menggunakan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk mengisolasi progesteron bebas dari larutan yang mengandung protein. Ma dan Cantwell (1999) berhasil menggabungkan teknik mikro ekstraksi pelarut dengan teknik ekstraksi balik menjadi teknik ekstraksi tetesan mikro untuk clean up dan prekonsentrasi analit yang terdiri dari metampetamin, mepentermin, 2-fenil etil amin dan metoksipenamin. Pada teknik ini sebanyak 30  $\mu$ l n-oktana diletakkan di tengah-tengah cincin teflon yang diletakkan tepat di atas larutan sampel dalam sebuah botol sampel dengan volume 1,6 ml dan pH 13. Kemudian, dengan bantuan mikro syring sebanyak 1  $\mu$ l larutan bufer pH 2.1 diletakkan di ujung jarum syring dan ditempatkan di dalam larutan n-oktana sehingga analit mula-mula terekstraksi ke dalam fasa organik kemudian terekstraksi balik ke dalam larutan bufer ber pH asam.

De Jager dan Andrews (1999) telah melaporkan penggunaan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis 11 macam senyawa pestisida organoklor. Volume pelarut organik sebanyak 2  $\mu$ l digunakan dalam eksperimen ini. Walaupun koefisien korelasinya baik, namun reproduibilitasnya rendah. Hal ini ditunjukkan dengan nilai simpangan baku relatifnya yang cukup besar (24,5%). Limit deteksi yang diperoleh sebesar 0,25  $\mu$ g/l. Kombinasi antara ekstraksi tetesan mikro dengan GC sistem cepat (*fast GC*) untuk analisis organoklorin dalam sampel air juga telah dilakukan (de Jager dan Andrews, 2000).

Liu dan Lee (2000) memperkenalkan teknik baru yaitu ekstraksi tetesan mikro secara kontinyu untuk analisis nitroaromatik dan klorobenzena. Pada teknik ini ekstraksi dilakukan pada vial yang terbuat dari kaca dengan volume total sekitar 0,5 ml. Vial tersebut dihubungkan dengan kapiler yang terbuat dari polyetereterketon (PEEK) yang berfungsi untuk mengalirkan sampel dan pelarut organik. Ekstraksi dilakukan secara kontinyu dengan cara mengalirkan sampel melalui vial yang telah diisi dengan pelarut organik pada ujung saluran masuk sampel ke vial sehingga sampel dan pelarut organik kontak secara langsung. Setelah ekstraksi selesai, maka pelarut organik diambil menggunakan syring GC dengan volume 10  $\mu$ l dan diinjeksikan ke injektor GC.

Psillakis dan Kalogerakis (2001) mengaplikasikan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis 11 macam bahan peledak nitroaromatik. Volume pelarut organik sebanyak 1  $\mu$ l digunakan untuk proses ekstraksi. Optimasi metode dilakukan dengan cara mengamati beberapa parameter diantaranya jenis pelarut organik, kecepatan pengadukan dan *ionic strength* larutan. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penambahan garam dalam larutan sampel menurunkan efisiensi ekstraksi. Menurut mereka, adanya garam pada larutan sampel menurunkan kecepatan difusi analit karena terjadinya perubahan sifat-sifat fisika dari film difusi Nernst.

Analisis kokain, kokaetilena, ecgonine metil ester, dan anhidroecgonine metil ester di dalam urin menggunakan ekstraksi tetesan mikro juga telah dilaporkan (de Jager dan Andrews, 2001). 2  $\mu$ l kloroform digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa tersebut dalam 2 ml sampel. Kinerja dari metode tersebut dievaluasi dengan menganalisis senyawa-senyawa tersebut dalam matriks yang berbeda yaitu airterdestilasi, urin buatan, dan urineyang dispikedengan senyawa-senyawa tersebut.

Palit et al (2005) menggunakan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis senyawa-senyawa yang biasanya digunakan dalam pengembangan senjata kimia secara GC/MS. Pelarut organik yang digunakan adalah campuran diklorometana dan karbon tetra klorida dengan perbandingan 3:1 (v/v). Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu optimum untuk proses ekstraksi adalah 30 menit dengan kecepatan pengadukan 300 rpm. Selain itu efisiensi ekstraksi dapat ditingkatkan jika konsentrasi garam dinaikkan sampai 30%.



Analisis insektiisida dalam air menggunakan ekstraksi tetesan mikro juga telah dilaporkan oleh Lambropoulou et al (2004). Dalam penelitian ini telah dianalisis 10 jenis insektisida organofosfor. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut organik toluena sebanyak 1,5 µl dengan penambahan garam 2,5% pada sampel. Limit deteksi berkisar antara 0,01-0,073 µg/l. Peneliti yang sama (Lambropoulou dan Albanis, 2004) juga menggunakan ekstraksi tetesan mikro untuk analisis *antifouling agent* dalam sampel air. Klorotalonil, diklofluanid, dan Sea nine 211 digunakan sebagai senyawa model. Dengan metode ini derajat prekonsentrasi lebih besar dari 10,7 dapat dicapai, sedangkan limit deteksinya berkisar antara 0,25-3 ng/l.

Fiamegos et al (2004) menggunakan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk menentukan kadar asam amino sebagai derivatnya secara GC. 12 jenis asam amino dalam matriks urin digunakan dalam penelitian ini. Etanol-piridin dan etilkloroformat (4:1) digunakan sebagai derivatif agent. Pelarut organik yang digunakan adalah campuran kloroform dan toluena dengan perbandingan 3:1. Besarnya limit deteksi dilaporkan sebesar 0,01-0,025 µg/ml untuk GC-FID dan 0,26-68 ng/ml untuk GC-MS(SIM).

Ekstraksi tetesan mikro juga diaplikasikan untuk analisis senyawa target dalam bahan makanan (Batlle dan Nerin, 2004). Sebanyak 7 jenis dialkil pftalat yang biasa terdapat dalam bahan makanan diekstraksi dari matriks makanan sebelum dianalisis dengan GC-FID. Recoverynya dengan metode spiking dilaporkan sebesar 85-115%.

Lopez-Blanco et al (2003) membandingkan SPME dan ekstraksi tetesan mikro untuk analisis  $\alpha$ - dan  $\beta$ -endosulfan dalam sampel air secara GC-ECD (*electron capture detector*). Endosulfan adalah golongan pestisida yang konsentrasinya di perairan tidak boleh lebih dari 1 µg/l dan 0,1 µg/l dalam air minum. Dalam penelitian ini 1,5 µl isooktan digunakan untuk mengekstraksi analit. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh kecepatan pengadukan, suhu, dan penambahan garam.

Teknik ekstraksi tetesan mikro tidak hanya digunakan untuk analisis senyawa organik, tetapi juga dapat diaplikasikan untuk analisis senyawa anorganik. Das et al (2004) membandingkan ekstraksi tetesan mikro dan *solid phase microextraction* (SPME) untuk analisis iodin dalam sediaan farmasi, garam

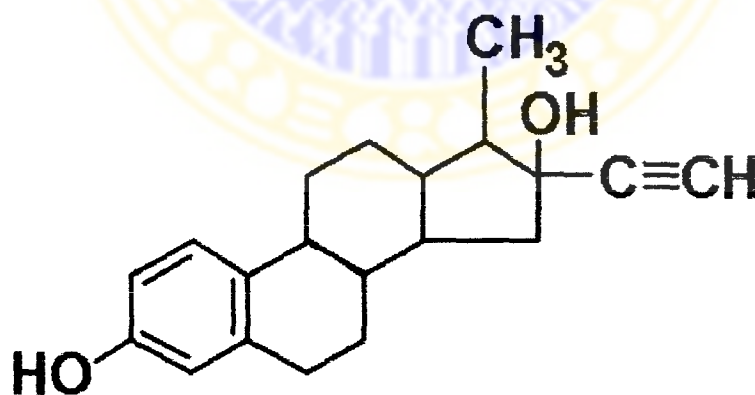
beriodium, susu, dan sayuran sebagai bentuk derivatifnya, 4-iodo-N,N-dimetilanilin, secara GC/MS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa limit deteksi dari metode yang menggunakan ekstraksi tetesan mikro ternyata lebih rendah dibandingkan dengan yang menggunakan SPME. Kedua metode menunjukkan linearitas pada rentang konsentrasi 0,1 µg-10 mg/l dengan recovery rata-rata 100,7% dan simpangan baku relatif rata-rata 3,1%.

### 3.3. Etinilestradiol

Etinilestradiol termasuk dalam golongan estrogen sintetis. Sedangkan estrogen merupakan salah satu golongan senyawa pengganggu fungsi endokrin (*endocrine disrupting compounds* (EDCs)) yang mendapatkan perhatian yang sangat luas dari peneliti dan pemerhati lingkungan karena efeknya yang membahayakan kesehatan. Etinilestradiol telah digunakan secara luas dalam pil kontraseptik.

Selain digunakan sebagai kontraseptik, estrogen secara umum digunakan untuk manajemen sindrom yang diakibatkan oleh proses menopause dan post menopause, untuk terapi defisiensi estrogen, dan untuk terapi kanker prostat pada laki-laki serta kanker payudara khususnya bagi wanita yang sudah mengalami masa menopause.

Struktur etinilestradiol ditunjukkan oleh gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3.5 Struktur etinilestradiol

Estrogen sintetis masuk ke lingkungan karena hasil pembuangan limbah industri maupun limbah rumah tangga dan seringkali terkonjugasi sebagai

senyawa glukuronida maupun sulfat. Senyawa-senyawa tersebut dapat berubah kembali menjadi senyawa induknya (tidak terkonjugasi) yang mempunyai sifat pencemar yang lebih tinggi (Ternes et al. 1999). Biasanya konsentrasi estrogen di lingkungan perairan berada pada tingkat lebih kecil dari ng/L sampai 10 ng/L. Diantara senyawa-senyawa golongan estrogen etinilestradiol mendapatkan perhatian yang tinggi karena tingginya efek estrogenik dari senyawa ini. Rendahnya polaritas senyawa ini, dengan koefisien partisi oktanol-air  $10^3$  sampai  $10^6$ , menyebabkan senyawa ini mudah sekali teradsorpsi oleh sedimen. Menurut Jurgens (1999) sebanyak 13-92% estrogen yang masuk ke lingkungan akan teradsorpsi oleh sedimen dalam jangka waktu 24 jam pertama setelah kontak.

Setiap tahun golongan senyawa terus disintesis untuk keperluan industri dan rumah tangga yang akhirnya dapat lepas ke lingkungan yang berakibat meningkatnya resiko pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, penanganan aktifitas senyawa-senyawa ini dalam matriks yang kompleks di lingkungan membutuhkan prosedur yang terintegrasi antara analisis secara kimia dan bio assay.

Rendahnya konsentrasi senyawa-senyawa ini membutuhkan metode preparasi sampel yang efektif dan metode analisis yang selektif dan sensitif. Metode preparasi sampel yang bisa digunakan diantaranya adalah metode immuno sorben, *dual column switching* LC-MS, dan ekstraksi fasa padat secara *on line* (Barcelo et al., 2003).

Beberapa metode untuk analisis etinilestradiol yang diawali dengan preparasi sampel sudah dilaporkan, diantaranya adalah derivatif spektrometri (Berzas et al, 1997), HPLC dengan detektor fluoresen (Gatti et al, 1998), ekstraksi fasa padat yang diikuti dengan analisis GC yang digabung dengan ionisasi kimia negative spektrometri massa sebagai turunan dari pentafluorobenzoil (Xiao et al, 2001) and pentafluorobenzil-trimetilsilil (Nakamura et al, 2001), ekstraksi fasa padat yang diikuti dengan solid GC/MS/MS sebagai turunan campuran N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroasetamida (MSTFA), trimetilsililimidazol (TMSI), and ditioeritrol (DTE) (Ternes et al., 1999), ekstraksi fasa padat yang diikuti analisis HPLC dengan detektor *diode array*-spektrometri massa (de Alda dan Barcelo, 2001), kromatografi afinitas dengan kolom tripeptida (Tozzi et al., 2002), GC-MS (Hernandez-Carrasquilla, 2001; Sawaya et al., 1998),

ekstraksi fasa padat yang diikuti LC tandem spektrometri massa (Isobe et al., 2003), dan dialisis dua fasa yang diikuti GC tandem spektrometri massa (Durant et al., 2002). De Alda dan Barcelo (2000) telah melaporkan analisis etinilestradiol dengan HPLC menggunakan detector diode array yang diawali dengan ekstraksi fasa padat sebagai teknik preparasi sampelnya. Müller (2003) menyarankan suatu metode preparasi sampel etinilestradiol yang didasarkan pada ekstraksi semi otomatis menggunakan membran hollow fiber dan selanjutnya dianalisis dengan GC-MS. Namun demikian, metode ini sangat tidak efektif karena waktu ekstraksinya yang lama, dimungkinkan terjadinya kebocoran larutan aseptor, dan persentase recoverynya sangat rendah (33.8%).

Lagana et al. (2000) telah melaporkan analisis estrogen menggunakan LC-MS-MS dengan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan GC-MS konvensional dalam hal kecepatan analisis, kesalahan, dan sensitifitasnya. Namun demikian instrumen-instrumen tersebut sangat mahal dan hanya ada di beberapa laboratorium di seluruh dunia. Oleh karena itu preparasi sampel melalui proses ekstraksi sangat diperlukan yang bertujuan untuk mengisolasi senyawa target dari matriks dan memekatkannya sehingga dengan konsentrasi yang sangat rendah masih dapat terdeteksi oleh instrumen analisis.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia FMIPA Unair selama 8 bulan dengan sistim *batch* dan *immersion*.

#### **4.2. Alat dan Bahan Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat HPLC dari Hewlet-Packard yang dilengkapi dengan integrator, peralatan gelas dan timbangan analitik untuk pembuatan larutan standar, jirigen dan botol plastik untuk tempat sampel, dan syring untuk melakukan proses ekstraksi tetesan mikro dan untuk menginjeksikan sampel ke injektor pada HPLC. Kolom yang digunakan adalah kolom tipe C18 dengan panjang 12,5 cm, diameter dalam 4 mm dengan ukuran partikel 4  $\mu\text{m}$ .

Bahan kimia yang digunakan berderajat pro analisis kecuali yang digunakan untuk eluen berderajat HPLC *grade*. Bahan-bahan yang digunakan adalah asetonitril, metanol, air, n-heksana, n-heptana, kloroform, karbon tetra klorida, toluena, n-butanol, dan etinilestradiol. Sedangkan sampel yang digunakan adalah limbah cair domestik/rumah tangga dari beberapa wilayah di Surabaya dan Sidoarjo Kota.

#### **4.3. Jenis dan Lokasi Pengambilan Sampel**

Jenis sampel penelitian adalah limbah domestic rumah tangga yang berupa cairan dan diperoleh dari Surabaya Utara, Surabaya Timur, Surabaya Selatan, Surabaya Barat, dan Sidoarjo Kota. Tim peneliti akan mengerjakan penelitian untuk daerah Surabaya Selatan, dan Sidoarjo kota sedangkan mahasiswa bimbingan skripsi mengerjakan penelitian untuk daerah Surabaya Utara, Surabaya Barat, dan Surabaya Timur. Pengambilan sampel dilakukan secara serentak pada tanggal 19 Nopember 2005 mulai pagi hari hingga siang hari. Pengambilan sampel dilakukan terutama di daerah-daerah yang padat penduduk dan mempunyai sistem pembuangan air (selokan). Di setiap daerah diambil 3 sampel yang dianggap mewakili daerah-daerah tersebut terutama dari

segi geografis. Sampel diletakkan di dalam jirigen plastik ukuran 2 liter yang telah diberi label lokasi pengambilan sampel dan waktu pengambilan sampel.

#### 4.4. Teknik Preservasi Sampel

Sampel disaring dengan kertas saring nitroasetat dengan ukuran pori 0,45  $\mu\text{m}$  untuk menghilangkan padatan yang ada dalam sampel sehingga diperoleh sampel yang sangat jernih. Penyaringan dibantu dengan penyedot vakum untuk mempercepat proses penyaringan. Sampel yang sudah disaring diletakkan dalam botol plastik yang sudah diberi label dan disimpan dalam *freezer* untuk menghindari proses biodegradasi sampel selama penyimpanan.

#### 4.5. Pembuatan Larutan

##### 4.5.1. Pembuatan Larutan Standar Etinilestradiol

Larutan induk etinilestradiol dibuat dengan cara melarutkan sejumlah padatan etinilestradiol standar dalam metanol 1% sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 100 ppm. Larutan standar dalam kisaran konsentrasi 1-6 mg/L dibuat dengan cara melarutkan sejumlah volume larutan induk.

##### 4.5.2. Pembuatan Eluen

Eluen dibuat dengan mencampurkan asetonitril, metanol dan air dengan perbandingan 3,5:1,5:4,5. Senyawa-senyawa penyusun eluan berderajat HPLC *grade*. Sebelum digunakan, eluen dihilangkan kandungan gas terlarutnya (*degassing*) dengan cara diaduk dengan pengaduk magnetik selama satu jam dan dilanjutkan dengan filtrasi vakum menggunakan kertas saring dengan ukuran pori 0,45  $\mu\text{m}$  untuk menghilangkan padatan yang mungkin ada dalam eluen.

#### 4.6. Penyiapan Instrumentasi HPLC

Analisis etinilestradiol dilakukan secara HPLC dengan cara *reverse phase* dan normal elusi. Sebelum digunakan untuk proses analisis maka kolom HPLC distabilkan dengan cara mengalirkan 100% metanol selama 1 jam mulai dengan kecepatan eluen 0,2 ml/menit sampai 1,0 ml/menit. Perlakuan ini juga dimaksudkan untuk membersihkan kolom dari sisa-sisa analit sebelumnya maupun pengotor yang mungkin masih tertinggal dalam kolom analitik.

Etinilestradiol diukur pada panjang gelombang 230 nm sesuai dengan hasil optimasi panjang gelombang yang sudah dilakukan sebelumnya.

#### 4.7. Analisis Larutan Standar Etinilestradiol Tanpa Ekstraksi Tetesan Mikro

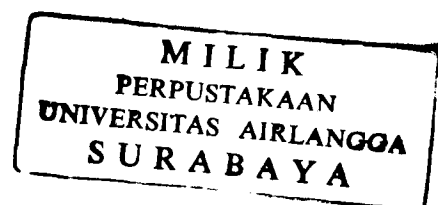
Disiapkan satu seri larutan standar dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 mg/l dalam 1% metanol. Diambil dengan syring 20 µl larutan tersebut dan diinjeksikan ke HPLC. Analisis dilakukan pada panjang gelombang 230 nm. Luas area yang diperoleh dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya. Selain itu disiapkan larutan blanko (larutan tanpa analit) dan dianalisis dengan HPLC sebanyak 10 kali replikasi. Dari data yang diperoleh kemudian ditentukan linearitas dan limit deteksinya.

#### 4.8 Optimasi Parameter-parameter Analitik

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

##### 4.8.1 Pengaruh Jenis Pelarut Organik

Dalam eksperimen ini akan dicoba beberapa jenis pelarut organik diantaranya adalah n-butanol, kloroform, n-heksana, dan n-heptana, karbon tetra klorida, dan toluena. Sebanyak 20,0 mL larutan standar etinilestradiol 4 mg/L dimasukkan ke dalam botol sampel yang sudah berisi pengaduk magnetik, kemudian botol ditutup dengan karet penutup. Syring yang ujungnya dihubungkan dengan jarum dan telah berisi 3 mikroliter toluena dimasukkan secara tegak lurus sampai ujung jarum masuk ke dalam larutan standar. Kemudian ujung syring ditekan sehingga toluena menggantung di ujung jarum. Larutan standar diaduk dengan kecepatan 100 rpm selama 15 menit. Toluena ditarik kembali ke dalam syring dan diinjeksikan ke HPLC. Prosedur yang sama dilakukan terhadap pelarut-pelarut organik yang lain. Kemudian diplot suatu grafik antara jenis pelarut organik dan luasan puncak/tinggi pucak.



#### 4.8.2 Pengaruh Volume Tetesan Pelarut Organik

Dalam eksperimen ini volume tetesan pelarut organik yang paling sesuai untuk proses ekstraksi yang diperoleh dari eksperimen di 4.8.1 divariasikan antara 1-5 mikroliter. Sementara variabel yang lain dibuat konstan seperti di prosedur 4.8.1. Kemudian diplot suatu grafik antara volume tetesan pelarut organik dan luasan puncak/tinggi puncak.

#### 4.8.3 Pengaruh Kecepatan Pengadukan

Dalam eksperimen ini kecepatan pengadukan divariasikan antara skala 2-5 pada alat pengaduk magnetik sementara variabel yang lain dibuat konstan seperti di prosedur 6.2.1. Pelarut organik yang digunakan di peroleh dari prosedur 4.8.1 dan volume tetesan pelarut organik optimum diperoleh dari prosedur 4.8.2.

#### 4.8.4 Pengaruh Waktu Ekstraksi

Dalam eksperimen ini waktu ekstraksi divariasikan antara 5-30 menit sementara variabel yang lain dibuat konstan seperti di prosedur 4.8.1. Pelarut organik yang digunakan di peroleh dari prosedur 4.8.1, volume tetesan pelarut organik optimum diperoleh dari prosedur 4.8.2, dan kecepatan pengadukan optimum diperoleh dari prosedur 4.8.3.

### 4.9. Pembuatan Kurva Standar Etinilestradiol

Sebanyak 20,0 mL larutan standar etinilestradiol 1 mg/mL diperlakukan seperti pada prosedur di 4.8.1 menggunakan parameter-parameter analitik yang telah dioptimasi pada prosedur 4.8.1 sampai 4.8.4. Prosedur yang sama dilakukan juga untuk larutan standar dengan konsentrasi 2, 3, 4, dan 5 mg/l. Dibuat plot grafik antara konsentrasi larutan standar dan luasan puncak/tinggi puncak.

### 4.10. Analisis Etinilestradiol dalam Limbah Domestik

Sebanyak 20,0 mL sampel diperlakukan seperti pada prosedur di 4.8.1 menggunakan parameter-parameter analitik yang telah dioptimasi pada prosedur 4.8.1 sampai 4.8.4. Kadar etinilestradiol dihitung dari persamaan regresi linear yang diperoleh dari prosedur 4.9.



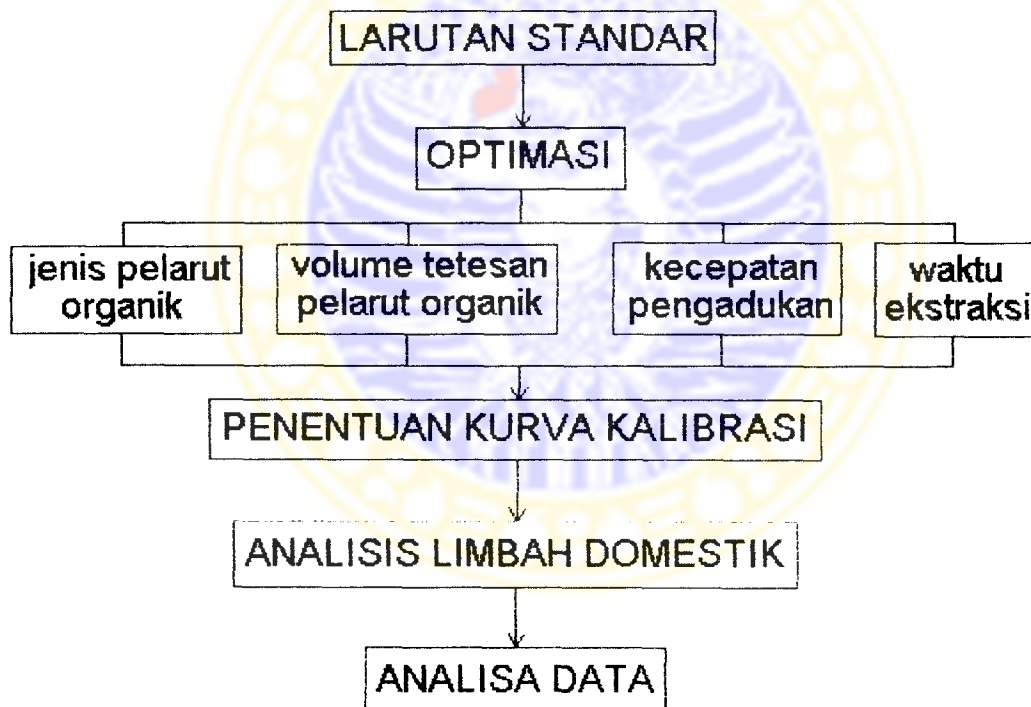
#### 4.11. Penentuan Recovery

Untuk mengetahui pengaruh matrik dalam sampel maka dilakukan uji *recovery* dengan metode *spiking*. Ke dalam sejumlah sampel limbah domestik yang telah disaring, dimasukkan sejumlah etinilestradiol sehingga diperoleh etinilestradiol dengan konsentrasi 2, 4, dan 5 mg/l. Kemudian sampel diperlakukan seperti prosedur 4.10 dan dihitung *recovery*-nya berdasarkan rumus:

$$\text{Recovery} = \frac{\text{konsentrasi zat yang diperoleh kembali}}{\text{konsentrasi zat yang ditambahkan}} \times 100\%$$

#### 4.12. Skema Kerja

Skema kerja pada analisis etinilestradiol dalam limbah domestik menggunakan nanoekstraksi tetesan mikro sebagai teknik preparasi sampel ditunjukkan oleh skema di bawah ini.



Gambar 4.1 Skema kerja analisis etinilestradiol dalam limbah domestik

## BAB V

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Penyiapan dan Optimasi Instrumentasi HPLC

HPLC merupakan salah satu instrumentasi analisis yang sering digunakan untuk analisis senyawa-senyawa organik baik dalam matrik biologi, lingkungan, makanan maupun dalam matriks yang lain. Salah satu jenis senyawa organik yang dapat ditentukan kadarnya dengan HPLC adalah etinilestradiol. Etinilestradiol menyerap cahaya pada dua panjang gelombang yaitu pada 215 nm dan 280 nm. Tetapi serapannya pada 215 nm lebih sensitif dibandingkan pada 280 nm. Namun demikian, analisis senyawa tertentu dalam matriks yang tertentu pula dengan HPLC membutuhkan tahapan penyiapan dan optimasi.

Penyiapan HPLC lebih diarahkan pada identifikasi peralatan yang menjadi bagian penting pada instrumentasi HPLC seperti injektor, kolom, pompa, detektor, dan integrator. Peralatan ini harus diperiksa sebelum proses analisis menggunakan HPLC dilakukan. Kolom merupakan salah satu bagian yang sangat penting pada instrumentasi HPLC. Sebelum digunakan, kolom harus distabilkan dengan cara mengalirkan sejumlah pelarut tertentu (misal metanol) dalam jangka waktu tertentu supaya kolom bersih dari sisa-sisa analit dan pengotor.

Optimasi HPLC diarahkan pada identifikasi parameter-parameter yang mempengaruhi proses analisis. Parameter-parameter tersebut diantaranya adalah jenis eluen, panjang gelombang maksimum, jenis kolom yang digunakan, tipe elusinya, waktu analisisnya, banyaknya sampel yang harus diinjeksikan, penentuan atenuasi (sensitifitas pengukuran), kecepatan kertas (untuk integrator manual), dan kecepatan alir eluen.

Eluen yang digunakan untuk analisis etinilestradiol secara HPLC ada beberapa macam diantaranya adalah campuran asetonitril: metanol: air = 3,5: 1,5: 4,5 (United States Pharmacopeia, 2000) dan campuran metanol: air = 70: 20 yang mengandung 0,5% asam format (Wu et al, 2000). Supriyanto (2005) telah membandingkan kinerja dua macam eluen ini untuk analisis etinilestradiol dalam sediaan farmasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa campuran asetonitril: metanol: air = 3,5: 1,5: 4,5 memberikan hasil yang terbaik. Oleh karena itu

komposisi eluen ini digunakan dalam penelitian ini tanpa dilakukan optimasi jenis eluen.

Optimasi panjang gelombang dilakukan dengan menganalisis larutan standar etinilestradiol pada panjang gelombang di sekitar 215 nm dan 280 nm karena spektrum yang khas dari etinilestradiol adalah pada panjang gelombang 215 nm dan 280 karena transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  pada cincin aromatik (de Alda dan Barcelo, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kromatogram pada panjang gelombang 230 nm memberikan visualisasi yang paling baik. Oleh karena itu analisis etinilestradiol dalam penelitian ini dilakukan pada panjang gelombang 230 nm.

*Reverse phase chromatography* semakin banyak digunakan dalam analisis suatu senyawa menggunakan HPLC karena pengoperasiannya yang lebih mudah jika dibandingkan dengan fasa normal. Dalam *reverse phase chromatography* analit dilarutkan dalam senyawa yang cukup polar (misal metanol) sedangkan kolom yang digunakan harus bersifat hidrofob. Jenis kolom yang bersifat hidrofob diantaranya adalah kolom yang berbasis C8 dan C18. Tipe kolom C18 dipilih dalam penelitian ini dengan spesifikasi kolom sebagai berikut: panjang kolom 12,5 cm, diameter kolom 4 mm, dan besar partikel penyusun kolom 4  $\mu\text{m}$ . Dengan demikian sistem yang digunakan adalah *reverse phase chromatography*. Sistem ini dipilih karena etinilestradiol adalah senyawa yang hidrofob dengan  $\log K_{ow}$  3,67 sehingga diharapkan senyawa ini mempunyai afinitas yang cukup tinggi terhadap fasa diam dalam kolom untuk menghasilkan pemisahan yang cukup baik.

Walaupun instrumentasi HPLC yang dimiliki oleh jurusan kimia dapat dioperasikan secara elusi gradien, metode elusi normal digunakan dalam penelitian ini. Hal ini berarti bahwa komposisi eluen selama proses elusi analit akan selalu tetap selama proses analisis.

Hasil penelitian pendahuluan untuk optimasi kecepatan alir eluen menunjukkan bahwa kecepatan alir eluen sebesar 1 ml/menit memberikan pemisahan yang sangat baik, demikian juga dengan *base linenya*. Dengan kecepatan alir tersebut, etinilestradiol terdeteksi pada waktu retensi sekitar 5 menit. Dengan demikian waktu analisis 8 menit diperkirakan sudah cukup untuk mengeluarkan semua komponen sampel dari kolom.

Selain parameter-parameter yang langsung berhubungan dengan instrumentasi HPLC, parameter-parameter yang berkaitan erat dengan integrator juga dioptimasi. Optimasi integrator khususnya dilakukan untuk menentukan kombinasi yang optimal antara atenuasi (sensitifitas pengukuran) dengan pemisahan peak pada kromatogram. Seting pada atenuasi rendah/ sensitifitas tinggi menghasilkan peak-peak yang tinggi yang berarti lebih sensitif. Tetapi kelemahannya adalah terjadinya ketidak stabilan pada *base line*. Demikian juga dengan pemilihan kecepatan kertas pada integrator. Kecepatan kertas yang rendah akan menghemat kertas dan menghasilkan peak-peak yang ramping dan simetris. Tetapi resolusinya menjadi tidak baik karena antara satu peak dengan peak yang lain tidak cukup terpisah dengan baik, bahkan seringkali overlap satu sama lain. Sebaliknya dengan menggunakan kecepatan tinggi, maka peak-peak akan terpisah dengan baik tetapi menghabiskan banyak kertas dan seringkali peaknya tidak simetris karena terjadi *broadening* dan *tailing* dari peak-peak tersebut.

Instrumentasi HPLC yang digunakan dalam penelitian ini dilengkapi dengan injektor dari Rheodyne model 7125. Model ini dilengkapi dengan *sample loop* yang volumenya 20  $\mu\text{l}$ . Untuk memperoleh hasil yang reproducibel maka volume sampel yang harus diinjeksikan minimal 4 kalinya atau 80  $\mu\text{l}$ . Tetapi dalam manual yang diberikan oleh Hewlett-Packard disebutkan bahwa injeksi sampel lebih kecil dari volume *sample loop* masih dapat dilakukan dan reproducibel jika operatornya sudah terlatih dengan baik. Dalam penelitian ini volume sampel yang digunakan adalah 20  $\mu\text{l}$ .

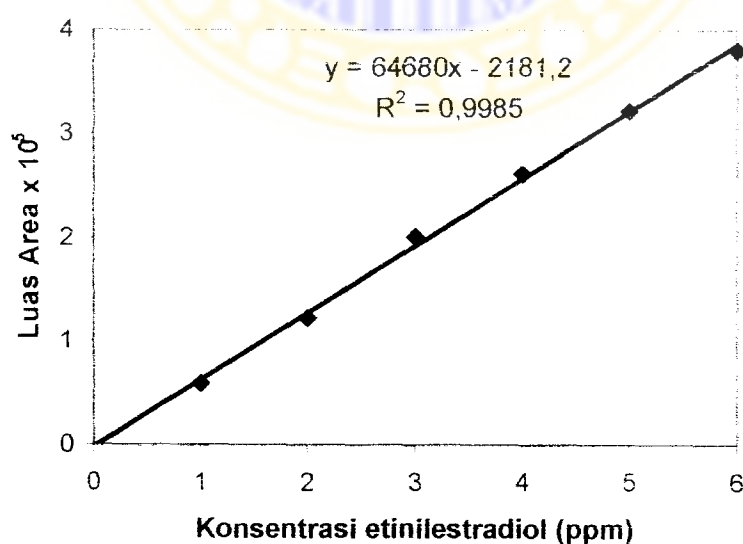
## 5.2. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Etinilestradiol Tanpa Ekstraksi Tetesan Mikro

Kurva kalibrasi merupakan sumber informasi yang penting untuk mengetahui korelasi antara konsentrasi analit dengan signal. Untuk analisis dengan HPLC, maka signalnya bisa berupa tinggi peak atau luas area peak. Umumnya luas area peak lebih sering digunakan karena mempunyai rentang konsentrasi yang lebih besar dibandingkan dengan tinggi peak. Kurva kalibrasi larutan standar etinilestradiol dibuat dengan menganalisis satu seri larutan standar dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 mg/l. Pemilihan rentang konsentrasi ini

disesuaikan dengan limit deteksi instrumentasi HPLC yang digunakan, yang secara visual dapat dilihat dari kromatogram yang dihasilkan jika analisis dilakukan dengan menggunakan parameter-parameter instrumentasi yang sudah dioptimasi yang sudah dijelaskan sebelumnya. Pemilihan rentang konsentrasi yang lebih rendah menyebabkan reproduibilitas pengukuran menjadi sangat rendah karena tingginya nilai simpangan baku relatifnya. Sedangkan pemilihan rentang konsentrasi yang lebih tinggi akan melemahkan tujuan penelitian ini karena penelitian ini dirancang untuk menghasilkan teknik preparasi sampel yang dapat digunakan untuk menganalisis kadar etinilestradiol dalam limbah domestik yang umumnya mengandung senyawa ini dengan konsentrasi yang sangat rendah. Hasil pengukuran larutan standar etinilestradiol dengan HPLC disajikan dalam tabel 5.1 dan gambar 5.1.

Tabel 5.1 Data luas area larutan standar etinilestradiol tanpa ekstraksi tetesan mikro

Konsentrasi etinilestradiol (mg/l)	Luas area rata-rata (n=5)	Simpangan baku relatif (%)
1	59061,2	2,57
2	122283	0,95
3	200701,2	2,80
4	261369,4	2,27
5	321627,6	1,48
6	380046	1,94



Gambar 5.1 Kurva kalibrasi etinilestradiol tanpa ekstraksi tetesan mikro

Hasil analisis linieritas menunjukkan bahwa harga koefisien korelasinya lebih besar dari 0,99 yang berarti ada korelasi linier antara konsentrasi standar etinilestradiol dengan luas area. Hal ini juga menunjukkan bahwa HPLC yang digunakan dalam penelitian ini dapat digunakan untuk analisis kuantitatif etinilestradiol pada rentang konsentrasi seperti pada kurva kalibrasi. Analisis sebanyak 5 replikasi untuk masing-masing konsentrasi menghasilkan simpangan baku relatif yang lebih kecil dari 3%. Ini menunjukkan adanya reproduktibilitas (presisi) pengukuran yang baik. Limit deteksi dihitung berdasarkan tiga kali signal to noise sebesar 0,3 ppm.

### 5.3. Optimasi Kondisi Ekstraksi

Faktor –faktor yang mempengaruhi efisiensi ekstraksi pada ekstraksi tetesan mikro diantaranya adalah waktu ekstraksi, jenis pelarut organik yang digunakan, volume pelarut organik yang digunakan, dan kecepatan pengadukan. Optimasi parameter ini dilakukan secara multivariat yaitu dengan merubah salah satu variabel untuk dioptimasi sementara variabel yang lain dibuat tetap.

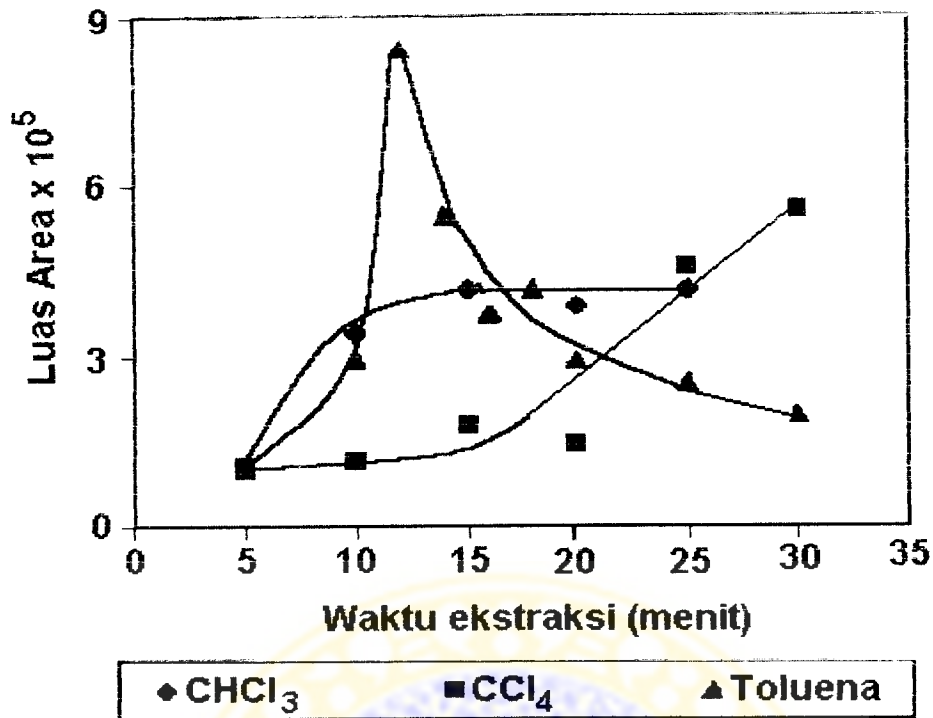
Optimasi jenis pelarut organik dan waktu ekstraksi dilakukan pada 5 jenis pelarut organik yaitu toluena, n-heksana, n-heptana, kloroform, dan karbon tetraklorida. Pada awal proposal diajukan 4 jenis pelarut yaitu n-butanol, n-oktanol, kloroform, n-heksana, dan n-heptana. Hasil percobaan pendahuluan menunjukkan bahwa kelarutan n-butanol dalam fasa cair sangat besar/ bercampur dengan fasa cair sehingga n-butanol tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi etinilestradiol dalam fasa cair. Hal ini berkaitan juga dengan syarat-syarat pelarut organik yang dapat digunakan dalam ekstraksi tetesan mikro, khususnya sistem *immersion*, yaitu tidak bercampur dengan fasa cair, non volatil, dan dapat melarutkan analit lebih baik dari fasa cair atau dengan kata lain harus mempunyai koefisien distribusi yang besar terhadap fasa cair. Sedangkan n-oktanol memiliki viskositas yang sangat besar sehingga sulit diambil dengan syring. Dengan demikian maka n-butanol dan n-oktanol tidak digunakan dalam penelitian ini. Sebagai penggantinya adalah karbon tetraklorida dan toluena.

Larutan standar etinilestradiol 4 ppm digunakan untuk menentukan pengaruh jenis pelarut organik dan waktu ekstraksi. Parameter yang dijaga konstan adalah kecepatan pengadukan (skala 2) dan volume pelarut organik (1

μl), sedangkan waktu ekstraksinya divariasi antara 5 sampai 30 menit. Masing-masing pelarut organik digunakan untuk mengekstraksi etinilestradiol dengan variasi waktu ekstraksi antara 5 sampai 30 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa n-heksana dan n-heptana tidak dapat mengekstraksi etinilestradiol walaupun waktu ekstraksinya sampai 30 menit, sedangkan kloroform, karbon tetraklorida, dan toluena mampu mengekstraksi senyawa tersebut. Bahkan semua n-heksana yang ada di tetesan mikro larut ke dalam fasa cair setelah 30 menit proses ekstraksi. Kloroform menunjukkan sifat-sifat yang sangat menarik. Sama dengan n-heksana, maka kloroform yang ada di tetesan mikro larut ke dalam fasa cair setelah 30 menit proses ekstraksi, walaupun sebenarnya kloroform mempunyai kemampuan yang baik untuk mengekstraksi etinilestradiol. Sebaliknya karbon tetraklorida dan toluena menunjukkan sifat-sifat yang superior dibandingkan dengan pelarut yang lain. Kemampuan ekstraksi karbon tetraklorida semakin meningkat dengan bertambahnya waktu ekstraksi, sedangkan kemampuan ekstraksi toluena maksimum setelah 12 menit ekstraksi. Setelah menit ke 12 kemampuan ekstraksi toluena turun drastis. Hal ini disebabkan rusaknya sistem film ekstraksi di lapisan luar fasa organik seperti dilaporkan juga oleh peneliti sebelumnya. Oleh karena itu toluena dipilih sebagai pelarut organik karena kemampuan ekstraksinya yang tinggi dengan waktu ekstraksi yang relatif singkat (12 menit). Hubungan antara waktu ekstraksi dan luas area peak untuk beberapa pelarut organik disajikan pada tabel 5.2 dan gambar 5.2.

Tabel 5.2 Hubungan antara waktu ekstraksi dan luas peak area pelarut organik

Waktu ekstraksi (menit)	Luas area rata-rata (n=2)		
	Kloroform	Karbon tetraklorida	Toluena
5	-	107961	100989,5
10	343856,5	117260	295107,5
12	-	-	843088,5
14	-	-	547086,5
15	416371	176537	-
16	-	-	374619,5
18	-	-	418619
20	390131	142574,5	295534,5
25	418602	458120,5	254357
30	-	556701,5	196631



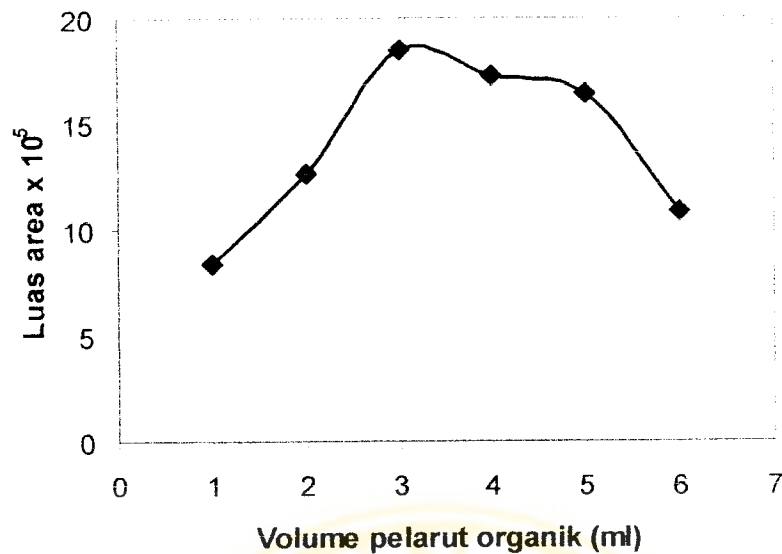
Gambar 5.2. Hubungan antara waktu ekstraksi dan luas peak pelarut organik

Pengaruh volume pelarut organik ditentukan secara eksperimen dengan menggunakan larutan standar etinilestradiol 4 ppm, pelarut organik toluena, dan dengan waktu ekstraksi 12 menit. Data hasil eksperimen ditunjukkan dalam tabel 5.3 dan gambar 5.3.

Tabel 5.3. Pengaruh volume pelarut organik terhadap luas peak

Volume pelarut organik ( $\mu\text{l}$ )	Luas area rata-rata (n=2)
1	843088,5
2	1268249
3	1851183
4	1724471,5
5	1644407
6	1084275





Gambar 5.3. Pengaruh volume pelarut organik terhadap luas peak

Efisiensi ekstraksi meningkat dengan meningkatnya volume pelarut organik sampai 3  $\mu$ l dan kemudian mulai berkurang sampai 6  $\mu$ l. Hasil pengamatan selama eksperimen menunjukkan bahwa tetesan mikro toluena sangat stabil sampai volume 3  $\mu$ l. Semakin bertambahnya volume toluena maka kemungkinan lepasnya tetesan mikro semakin besar. Oleh karena itu volume toluena 3  $\mu$ l dipilih sebagai volume optimum.

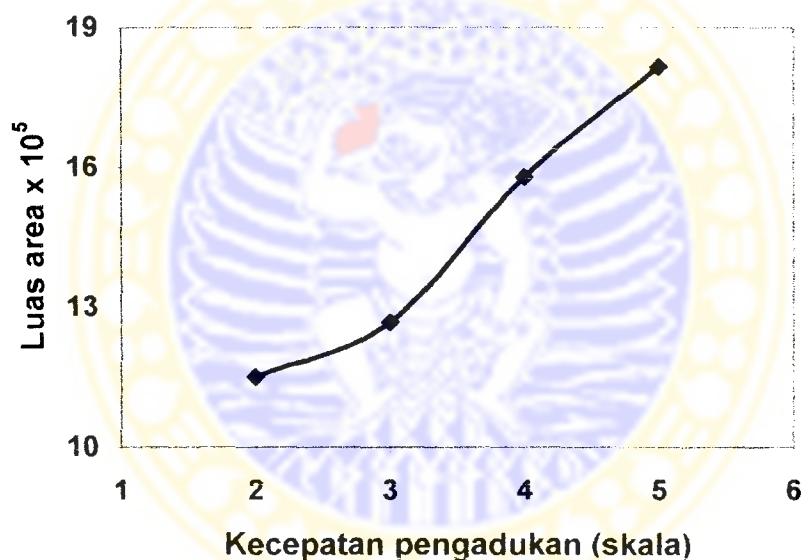
Optimasi kecepatan pengadukan dilakukan pada larutan standar etinilestradiol 4 mg/l, menggunakan toluena sebagai pelarut organik dengan volume 3  $\mu$ l dan ekstraksi dilakukan selama 12 menit. Umumnya semakin besar kecepatan pengadukan maka semakin meningkat juga efisiensi ekstraksinya. Tetapi kecepatan pengadukan yang terlalu besar juga mempunyai kelemahan yaitu mempercepat pelarutan pelarut organik dalam fasa cair. Oleh karena itu perlu dipilih kecepatan pengadukan yang memberikan signal optimal tetapi juga menjamin bahwa pelarut organik tidak mudah larut dalam fasa cair. Data pengaruh kecepatan pengadukan terhadap efisiensi ekstraksi tetesan mikro diberikan pada tabel 5.4 dan gambar 5.4.

Dari gambar 5.4 terlihat bahwa efisiensi ekstraksi meningkat tajam pada rentang kecepatan pengadukan menggunakan skala 2 sampai 5. Tetapi semakin

besar kecepatan pengadukan, semakin besar pula kemungkinan bagi tetesan mikro untuk lepas karena pada kecepatan pengadukan yang tinggi tetesan mikro menjadi tidak stabil. Oleh karena itu walaupun efisiensi ekstraksi pada skala 5 yang paling besar, tetapi dalam eksperimen selanjutnya skala 4 yang dipilih.

Tabel 5.4 Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap efisiensi ekstraksi

Kecepatan pengadukan (skala)	Luas area rata-rata (n=2)
2	249356,5
3	1266231
4	1579234,5
5	1814318,5



Gambar 5.4 Pengaruh kecepatan pengadukan terhadap kecepatan pengadukan

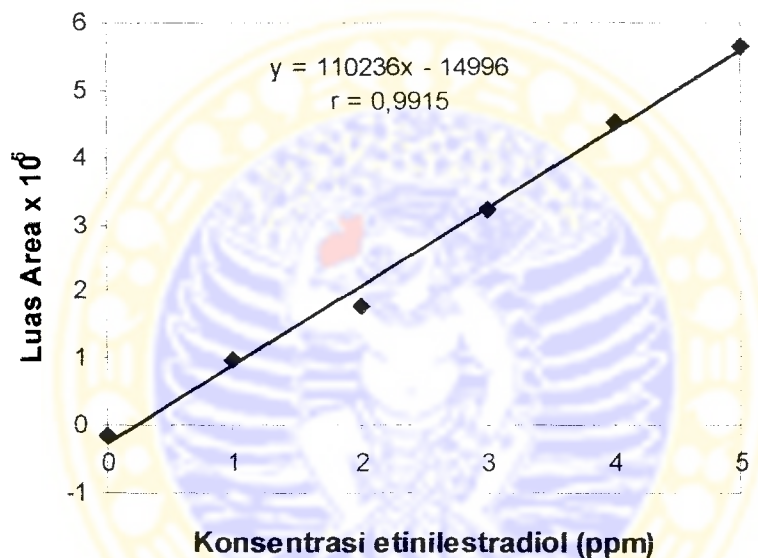
#### 5.4. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Etinilestradiol Dengan Ekstraksi Tetesan Mikro pada Kondisi Optimum

Kondisi ekstraksi optimum yang sudah didapatkan digunakan untuk membuat kurva kalibrasi larutan standar etinilestradiol yang ditentukan dengan cara ekstraksi tetesan mikro. Kondisi optimum tersebut adalah pelarut organik toluena dengan volume 3  $\mu$ l, waktu ekstraksi 12 menit, dan dengan kecepatan

pengadukan pada skala 4. Hasil pengukuran larutan standar etinilestradiol dengan ekstraksi tetesan mikro secara HPLC disajikan dalam tabel 5.5 dan gambar 5.5.

Tabel 5.5 Data luas area larutan standar etinilestradiol dengan ekstraksi tetesan mikro

Konsentrasi etinilestradiol (ppm)	Luas area rata-rata (n=2)
1	97966
2	176895,5
3	322432
4	451519,5
5	565572



Gambar 5.5. Kurva kalibrasi larutan standar etinilestradiol dengan ekstraksi tetesan mikro

Dari gambar 5.5 terlihat bahwa terdapat korelasi linier antara konsentrasi etinilestradiol dengan signal (luas peak). Hal ini ditunjukkan dengan harga koefisien korelasi yang lebih besar dari 0,99. Jika dibandingkan dengan kurva kalibrasi larutan standar etinilestradiol tanpa ekstraksi tetesan mikro, maka teknik ekstraksi tetesan mikro dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran. Ini ditunjukkan dengan nilai slope yang lebih besar dan nilai limit deteksi yang lebih kecil. Limit deteksi ditentukan juga dengan tiga kali signal to noise sebesar 0,15 ppm. Perbandingan parameter analitik antara kurva kalibrasi tanpa dan dengan ekstraksi tetesan mikro disajikan dalam tabel 5.6.

Tabel 5.6. Perbandingan parameter analitik antara ekstraksi tetesan mikro dengan teknik tanpa ekstraksi

Parameter analitik	Ekstraksi tetesan mikro	
	Dengan	Tanpa
Linieritas	linier	linier
Koefisien korelasi ( $r^2$ )	0,9915	0,9985
Persamaan regresi	$Y = 110236X - 14996$	$Y = 64680X - 2181,2$
Slope	110236	64680
Rentang konsentrasi (ppm)	1-5	1-6
Limit deteksi (ppm)	0,15	0,3

### 5.5. Analisis Etinilestradiol dalam Limbah Domestik

Analisis etinilestradiol dalam sampel dilakukan dengan menggunakan metode analisis yang telah dioptimasi. Dari 15 sampel yang berasal dari Surabaya Timur, Surabaya Utara, Surabaya Barat, Surabaya Selatan, dan Sidoarjo Kota tidak satupun sampel yang mengandung etinilestradiol dengan kadar yang dapat dideteksi dengan instrumentasi HPLC yang digunakan dalam penelitian ini. Dengan kata lain etinilestradiol mungkin ada di perairan tersebut tetapi kadarnya di bawah limit deteksi instrumen atau di perairan tersebut memang tidak terdapat etinilestradiol. Menurut Jurgens et al (1999) etinilestradiol yang lepas ke lingkungan air sebagian besar diserap oleh sedimen dalam waktu kurang dari 2 jam, sedangkan konsentrasi rata-rata senyawa tersebut di fasa cair berkisar antara 1-10 ng/l.

Untuk mengetahui kinerja teknik ekstraksi tetesan mikro yang sudah dioptimasi, maka dilakukan analisis etinilestradiol dalam sampel (limbah domestik) dari kelima daerah tersebut dengan metode spiking. Metode spiking dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah etinilestradiol yang sudah diketahui konsentrasinya ke dalam limbah domestik sehingga didapatkan konsentrasi etinilestradiol dalam limbah domestik 2, 4, dan 5 ppm. Kemudian kadar etinilestradiol dalam limbah domestik tersebut ditentukan kembali dengan teknik ekstraksi tetesan mikro. Dari hasil analisis didapatkan recovery sekitar 97-103%.

Hal ini menunjukkan bahwa metode yang dikembangkan dapat digunakan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik.



## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Teknik ekstraksi tetesan mikro dapat digunakan untuk analisis etinilestradiol.
2. Kondisi optimum ekstraksi tetesan dicapai dengan menggunakan pelarut organik toluena 3  $\mu$ l, waktu ekstraksi 12 menit dan dilakukan pengadukan dengan pengaduk magnetik dengan skala 4.
3. Teknik ekstraksi tetesan mikro dapat diaplikasikan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik dengan teknik spiking didapatkan recovery berkisar antara 97-103%.
4. Hasil analisis menggunakan ekstraksi tetesan mikro secara HPLC menunjukkan bahwa kadar etinilestradiol dalam limbah domestik di daerah Surabaya dan Sidoarjo Kota berada di bawah limit deteksi instrumen.

#### **6.2. Saran**

Metode yang sudah dioptimasi sebaiknya diaplikasikan untuk analisis kadar etinilestradiol dalam sedimen karena etinilestradiol di perairan lebih mudah diadsorpsi oleh sedimen berdasarkan sifat hidrofobnya.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Barcelo D, Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda MJ, Kampioti A, Environmental Analysis (2003)
- Battle, R., dan Nerin, C., J. of Chrom. A 1045(2004)29
- Berzas, J. J., J. Rodriguez, G. Castaneda, Analyst 122(1997)41
- Das, P., Gupta, M., Jain, A., dan Verma, K.K., J. of. Chrom. A 1023(2004)33
- de Alda, M.J.L., D. Barcelo, J. of Chromatography A 892(2000)391
- de Alda, M.J.L., D. Barcelo, J. of Chromatography A 938(2001)145
- de Jager, L.S., Andrews, A.R.J., Chromatographia 50(1999)733
- de Jager, L.S., Andrews, A.R.J., Analyst 125(2000)1943
- de Jager, L.S., Andrews, A.R.J., J. Chromatogr. A 911(2001)97
- Durant, A.A., C.A. Fente, C.M. Franco, B.I. Vasquez, S. Mayo, A. Cepeda, J. of Chromatography B 766(2002)251
- Fiamegos, Y., Nanos, C.G., dan Stalikas, C.D., J. of Chrom. B 813(2004)89
- Gatti, R., R. Gotti, M.G. Gioia, V. Cavrini, J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 17(1998)337
- Hernandez-Carrasquilla, M., Anal. Chim. Acta 434(2001)59
- He, Y., Lee, H.K., Anal. Chem. 69(1997)4634
- Isobe, T., H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, J. of Chromatography A 984(2003)195
- Jeannot, M., Cantwell, F.F., Anal. Chem. 68(1996)2236
- Jeannot, M., Cantwell, F.F., Anal. Chem. 69(1997)235
- Jeannot, M., Cantwell, F.F., Anal. Chem. 69(1997)2935
- Jurgens MD, Williams RJ, Johnson AC, (1999) Research and Development Technical Report P161, Environmental Agency, Bristol

- Lagana A., Bacaloni A., Fago G., Marino A., *Rapid Commun Mass Spectrom* 14(2000)401
- Lambropoulou, D. dan Albanis, T.A., *J. Of Chrom. A* 1049(2004)17
- Lambropoulou, D.A., Psillakis, E., Albanis, T.A., dan Kalogerakis, N., *Anal. Chim. Acta* 516(2004)205
- Liu, H., dan Dasgupta P. K., *Anal. Chem.* 68(1996)1817
- Liu, W., Lee, H.K., *Anal. Chem.* 72(2000)4462
- Lopez-Blanco, M.C., Cancho-Grande, B., dan Simal\_gandara, J., *J. of Chrom. A* 984(2003)245
- Ma, M., Cantwell, F.F., *Anal. Chem.* 71(1999)388
- Müller, S., M. Möder, S. Schrader, P. Popp, *J. of Chromatography A* 985(2003)99
- Nakamura, S., T.H. Sian, S. Daishima, *J. of Chromatography A* 919(2001)275
- Palit, M., Pardasani, D., Gupta, A.K., dan Dubey, D.K., *Anal. Chem* 77(2005)711
- Psillakis, E., Kalogerakis, N., *J. Chromatogr. A* 907(2001)211
- Sawaya, W. N., K. P. Lone, A. Husain, B. Dashti, S. Al-Zenki, *Food Chemistry* 63(1998)563
- Supriyanto, G., *Chromatomembrane Method Applied in Pharmaceuticals Analysis*, Logos Verlag Berlin, 2005
- Ternes, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R.D. Wilken, M. Servos, *The Science of the Total Environment* 225(1999) 81
- Ternes TA, Kreckel P, Mueller J, *Sci Total Environ* 225(1999)91
- Tozzi, C., L. Anfossi, G. Giraudi, C. Giovannoli, C. Baggiani, A. Vanni, *J. of Chromatography A* 966(2002)71
- United States Pharmacopeia, *US Pharmacopeial Convention*, Rockville, MD, 2000, 24<sup>th</sup> ed., 965
- Wang, Y., Kwok, Y.C., He, Y., Lee, H.K., *Anal. Chem.*, 70(1998)733
- Xiao, X.Y., D.V. McCalley, J. McEvoy, *J. of Chromatography A* 923(2001)195



# LAMPIRAN



**Rahma Nila**

Nanoekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik pada limbah domestik di daerah Surabaya Timur

**ABSTRAK**

Telah dilakukan penelitian tentang aplikasi ekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik etinilestradiol dalam limbah domestik di daerah Surabaya dan Sidoarjo. Etinilestradiol merupakan estrogen sintetik yang tergolong *endocrine disrupting compounds*. Senyawa ini merupakan salah satu komponen pil kontrasepsi. Lepasnya senyawa ini ke lingkungan memberikan efek yang negatif. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu teknik preparasi sampel yang mempunyai selektivitas dan sensitivitas yang tinggi untuk analisis senyawa ini. Tujuan penelitian ini adalah mengoptimasikan dan menerapkan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, menghasilkan suatu metode preparasi sampel yang lebih sederhana, cepat, murah, selektif, sensitif, dan ramah lingkungan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, mengidentifikasi penyebaran dan konsentrasi senyawa tersebut dalam limbah domestik, dan memberikan informasi kepada instansi terkait tentang penyebaran senyawa-senyawa tersebut di lingkungan untuk digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun kebijakan-kebijakan yang berkaitan dengan permasalahan lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis dan volume pelarut organik, kecepatan pengadukan, dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi. Kondisi optimum ekstraksi tercapai jika menggunakan pelarut toluena dengan volume 3  $\mu$ l, dengan kecepatan pengadukan skala 4 dan waktu ekstraksi 12 menit. Selain itu aplikasi ekstraksi tetesan mikro dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran karena mempunyai limit deteksi yang lebih kecil. Teknik ekstraksi tetesan mikro yang sudah dioptimasi dapat diaplikasikan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik dari daerah Surabaya Timur dengan metode spiking dengan recovery 97-103%.

Keywords: ekstraksi tetesan mikro; etinilestradiol; limbah domestik

**Alfa Akustia**

Nanoekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik pada limbah domestik di daerah Surabaya Utara

**ABSTRAK**

Telah dilakukan penelitian tentang aplikasi ekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik etinilestradiol dalam limbah domestik di daerah Surabaya dan Sidoarjo. Etinilestradiol merupakan estrogen sintetik yang tergolong *endocrine disrupting compounds*. Senyawa ini merupakan salah satu komponen pil kontrasepsi. Lepasnya senyawa ini ke lingkungan memberikan efek yang negatif. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu teknik preparasi sampel yang mempunyai selektivitas dan sensitivitas yang tinggi untuk analisis senyawa ini. Tujuan penelitian ini adalah mengoptimasikan dan menerapkan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, menghasilkan suatu metode preparasi sampel yang lebih sederhana, cepat, murah, selektif, sensitif, dan ramah lingkungan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, mengidentifikasi penyebaran dan konsentrasi senyawa tersebut dalam limbah domestik, dan memberikan informasi kepada instansi terkait tentang penyebaran senyawa-senyawa tersebut di lingkungan untuk digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun kebijakan-kebijakan yang berkaitan dengan permasalahan lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis dan volume pelarut organik, kecepatan pengadukan, dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi. Kondisi optimum ekstraksi tercapai jika menggunakan pelarut toluena dengan volume 3  $\mu\text{l}$ , dengan kecepatan pengadukan skala 4 dan waktu ekstraksi 12 menit. Selain itu aplikasi ekstraksi tetesan mikro dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran karena mempunyai limit deteksi yang lebih kecil. Teknik ekstraksi tetesan mikro yang sudah dioptimasi dapat diaplikasikan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik dari daerah Surabaya Utara dengan metode spiking dengan recovery 97-103%.

Keywords: ekstraksi tetesan mikro; etinilestradiol; limbah domestik

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Ratih Abdiani**

Nanoekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik pada limbah domestik di daerah Surabaya Barat

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang aplikasi ekstraksi tetesan mikro untuk analisis estrogen sintetik etinilestradiol dalam limbah domestik di daerah Surabaya dan Sidoarjo. Etinilestradiol merupakan estrogen sintetik yang tergolong *endocrine disrupting compounds*. Senyawa ini merupakan salah satu komponen pil kontrasepsi. Lepasnya senyawa ini ke lingkungan memberikan efek yang negatif. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu teknik preparasi sampel yang mempunyai selektivitas dan sensitivitas yang tinggi untuk analisis senyawa ini. Tujuan penelitian ini adalah mengoptimasikan dan menerapkan teknik ekstraksi tetesan mikro untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, menghasilkan suatu metode preparasi sampel yang lebih sederhana, cepat, murah, selektif, sensitif, dan ramah lingkungan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik, mengidentifikasi penyebaran dan konsentrasi senyawa tersebut dalam limbah domestik, dan memberikan informasi kepada instansi terkait tentang penyebaran senyawa-senyawa tersebut di lingkungan untuk digunakan sebagai pertimbangan dalam menyusun kebijakan-kebijakan yang berkaitan dengan permasalahan lingkungan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis dan volume pelarut organik, kecepatan pengadukan, dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi. Kondisi optimum ekstraksi tercapai jika menggunakan pelarut toluena dengan volume 3  $\mu$ l, dengan kecepatan pengadukan skala 4 dan waktu ekstraksi 12 menit. Selain itu aplikasi ekstraksi tetesan mikro dapat meningkatkan sensitivitas pengukuran karena mempunyai limit deteksi yang lebih kecil. Teknik ekstraksi tetesan mikro yang sudah dioptimasi dapat diaplikasikan untuk analisis etinilestradiol dalam limbah domestik dari daerah Surabaya Barat dengan metode spiking dengan recovery 97-103%.

Keywords: ekstraksi tetesan mikro; etinilestradiol; limbah domestik

## DATA KURVA KALIBRASI LARUTAN STANDAR ETINILESTRADIOL TANPA EKSTRAKSI TETESAN MIKRO

Konsentrasi etinilestradiol (ppm)	Waktu retensi (menit)	Luas Area	Rata - Rata
1	5,679	57642	59061,2
	5,692	59814	
	5,970	59080	
	6,013	57591	
	5,976	61179	
2	6,053	124219	122283
	5,958	122252	
	5,943	121489	
	5,489	121250	
	5,849	122205	
3	5,872	194850	200701,2
	5,779	203042	
	5,809	194483	
	5,498	204761	
	5,448	206370	
4	6,263	264942	261369,4
	6,225	266862	
	5,727	262225	
	5,706	261333	
	5,750	251485	
5	6,135	325085	321627,6
	5,937	323336	
	5,980	324710	
	5,998	321510	
	6,041	313497	
6	5,477	379545	380046
	5,502	378568	
	5,617	387993	
	5,499	385280	
	5,652	368844	