

**VALIDASI METODE ANALISIS SURFAKTAN ANIONIK NATRIUM DODESIL
BENZENA SULFONAT (SDBS) DALAM IKAN LELE SECARA
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS MENGGUNAKAN ACRIDINE ORANGE**

**ANALITICAL METHOD VALIDATION OF ANIONIC SURFACTANT SODIUM
DODECYL BENZENE SULFONATE (SDBS) IN CATFISH BY UV-VIS
SPECTROPHOTOMETRY USING ACRIDINE ORANGE**

Monica Cahyaning Ratri^{a*}, Adhitasari Suratman^b dan Roto^b

^aProgram Studi Pendidikan Kimia, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, 55282

^bJurusan Ilmu Kimia, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

* email : monicacr.mcr@gmail.com

DOI : 10.20961/alchemy.v13i2.8916

Received 19 April 2017, Accepted 6 June 2017, Published online 1 September 2017

ABSTRAK

Pengembangan metode analisis surfaktan anionik natrium dodesil benzena sulfonat (SDBS) secara spektrofotometri UV-Vis menggunakan *acridine orange* (AO) dalam ikan lele telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kondisi optimum analisis dan parameter validasi metode analisis SDBS dalam tubuh ikan lele. Penelitian ini dibagi dua tahap, yaitu isolasi SDBS dalam tubuh ikan lele dengan ekstraksi Soxhlet dan analisis SDBS. Analisis SDBS didasarkan pada pembentukan pasangan ion antara dodesil benzena sulfonat (DBS) dan AO. Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis dilakukan pada panjang gelombang maksimum pasangan ion DBS dan AO 499 nm dengan menggunakan etanol sebagai pelarut AO dan perbandingan mol DBS:AO sebesar 2:1, serta pH optimum 2,97. Validasi metode menunjukkan nilai linearitas (r) 0,998, batas deteksi 0,0343 mg/L, batas kuantifikasi 0,104 mg/L, presisi 0,382 - 1,78 %, sensitivitas $4,64 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dan akurasi 82,11 - 100,3 %.

Kata kunci: *acridine orange*, lele, surfaktan, validasi.

ABSTRACT

The analytical method development on an anionic surfactant of sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) in a catfish using spectrophotometer UV-Vis using acridine orange (AO) has been conducted. This research aims to determine the optimum conditions of analysis and to determine validation parameters of sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) analysis in a catfish. This study was divided into two steps, isolation of sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS) in the catfish with soxhlet extraction and the analysis of SDBS. The analysis of sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) is based on the formation of ion pair between dodecylbenzenesulfonate (DBS) and acridine orange (AO). The results showed that the analysis can be performed at 499 nm, using ethanol as acridine orange (AO) solvent, the mole ratio of dodecylbenzenesulfonate (DBS) acridine orange (AO) 2:1, and pH 2.97. The parameters of

validation had good acceptability as linearity (r) 0.998, limit of detection 0.0343 mg/L and limit of quantification 0.104 mg/L, precision 0.382 - 1.78 %, sensitivity $4.64 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and accuracy (82.11 - 100.3 %).

Keyword: *acridine orange*, catfish, SDBS, validation.

PENDAHULUAN

Surfaktan merupakan salah satu bahan yang dapat dimanfaatkan diberbagai bidang kehidupan, baik di bidang industri, makanan, rumah tangga, kosmetik dan farmasetika (Ogeleka *et al.*, 2010). Surfaktan merupakan bahan aktif yang unik karena mempunyai sisi hidrofobik dan sisi hidrofilik, dan mampu berinteraksi dengan pelarut sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan (Knepper *et al.*, 2003). Penggunaan surfaktan pada tahun 2008 mencapai 13 juta ton dan jenis surfaktan yang paling banyak digunakan adalah *sodium dodecyl benzene sulfonate* (SDBS) yang merupakan bagian dari *surfaktan* anionik jenis *linear alkylbenzene sulfonate* (LAS) (Rust, 2008; Sirisattha *et al.*, 2004).

Kecenderungan surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan pelarut menyebabkan surfaktan berbahaya bagi kesehatan. Paparan surfaktan pada jumlah yang banyak dalam waktu singkat dapat menyebabkan iritasi kulit dan kerusakan mata, selain itu juga dapat mengakibatkan iritasi pada hidung serta menyebabkan batuk. Paparan surfaktan pada jangka waktu yang panjang mengakibatkan *bronchitis* (Anonim, 2002).

Analisis surfaktan pada makhluk hidup air pada khususnya ikan perlu dilakukan karena berdasarkan sifatnya, surfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan air. Oleh karena sifat dari surfaktan tersebut, surfaktan juga dapat menurunkan tegangan permukaan pada insang ikan dan menyebabkan surfaktan dapat terserap melalui insang dan masuk ke dalam sistem tubuh ikan. Masuknya surfaktan ke dalam tubuh ikan dapat menurunkan kualitas bahan pangan karena surfaktan dapat mendenaturasi protein pada bahan pangan tersebut. Surfaktan dapat terakumulasi di dalam tubuh ikan, sehingga apabila ikan dikonsumsi oleh manusia maka dapat menimbulkan efek toksik. Ikan lele merupakan ikan air tawar yang berpotensi tinggi mengakumulasi surfaktan karena mampu bertahan hidup di lingkungan yang tercemar. Selain itu ikan lele merupakan jenis ikan yang banyak dikonsumsi masyarakat, sehingga validasi metode analisis surfaktan pada tubuh ikan lele perlu dilakukan.

Analisis surfaktan anionik dapat dilakukan dengan metode *reverse flow injection analysis* (rFIA) oleh Yu *et al.* (2011). Metode spektrofotometri juga banyak digunakan untuk analisis surfaktan anionik. Analisis secara spektrofotometri dapat dilakukan dengan

menggunakan pereaksi *methylene blue* (Ogeleka *et al.*, 2010), *ethyl violet* (Yamamoto and Motomizu, 1987), *rhodamine B* dan *rhodamine 6G* (Tajalli *et al.*, 2009), dan *acridine orange* (Adak *et al.*, 2005). Terdapat beberapa kekurangan dalam analisis surfaktan anionik dengan metode dan pereaksi tersebut, yaitu bahan yang kurang ramah lingkungan dan biaya operasionalnya mahal. Analisis surfaktan anionik secara spektrofotometri dengan pereaksi *acridine orange* merupakan salah satu metode analisis surfaktan yang cukup ramah lingkungan karena menggunakan pelarut organik yang lebih ramah lingkungan yaitu toluena dan jumlah bahan yang dibutuhkan sedikit jika dibandingkan dengan metode standar menggunakan pereaksi *methylene blue*.

Penentuan konsentrasi surfaktan pada makhluk hidup banyak dilakukan. Penelitian penentuan konsentrasi surfaktan pada tubuh makhluk hidup dapat dilakukan dengan HPLC dan spektrofotometer (Tolls *et al.* 1999; Saez *et al.* 2000; Datta *et al.* 2002; Purba, 2014), namun metode yang dipergunakan membutuhkan bahan dengan toksisitas tinggi dan kurang ramah lingkungan. Penggunaan HPLC dalam analisis surfaktan menghasilkan sensitivitas yang baik akan tetapi proses preparasi sampel yang lebih lama dan biaya operasional yang mahal serta ketersediaan alat yang terbatas.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka diperlukan suatu metode alternatif dalam analisis surfaktan anionik jenis SDBS dalam tubuh ikan lele. Metode tersebut diharapkan merupakan suatu metode yang mudah dilakukan, biayanya murah dan lebih ramah lingkungan. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan analisis surfaktan dalam tubuh ikan lele dengan alat spektrofotometri UV-Vis menggunakan pereaksi *acridine orange* dan diharapkan menghasilkan nilai limit deteksi yang rendah, koefisien korelasi yang mendekati 1, standar deviasi yang rendah serta sensitivitas yang baik.

METODE PENELITIAN

Alat yang dipergunakan adalah alat Soxhlet, spektrofotometer UV-Vis (Cintra GBC 2020), blender, *rotary evaporator* Buchi (CH-9230 flawil/schweiz), *freeze dryer*, lemari pendingin, timbangan analitik, pH meter (Toa). Bahan yang dipergunakan adalah *sodium dodecylbenzenesulfonate* (SDBS) dan *acridine orange* [3,6-bis(dimethylamino) acridine] dari Sigma Aldrich. Toluena, asam asetat glasial, metanol, etanol, n-heksana, isopropil alkohol diperoleh dari E-merck, dimana semua bahan menggunakan kualitas pro analisis dan sampel ikan lele yang dibudidayakan di kolam ikan dengan kondisi terkontrol.

Pembuatan Larutan Standar

Pembuatan larutan induk SDBS 1000 mg/L

SDBS sebanyak 0,1004 g dilarutkan dalam 50 mL akuabides. Larutan SDBS kemudian diencerkan dengan labu takar 100 mL. Larutan standar SDBS dibuat setiap kali analisis dilakukan.

Pembuatan larutan seri SDBS

Larutan 10,0 mg/L SDBS dibuat dari larutan induk SDBS 1000 mg/L sebanyak 1 mL yang dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL diencerkan sampai tanda batas dengan akuabides. Larutan standar dibuat dengan mengencerkan larutan SDBS 10,0 mg/L hingga konsentrasi SDBS 0,400; 0,800; 1,60; 3,20; 4,00 dan 6,00 mg/L.

Pembuatan larutan *acridine orange* (AO)

Larutan induk AO 5×10^{-3} M dibuat dengan melarutkan 0,0663 g padatan AO ke dalam 10 mL etanol, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Larutan disimpan pada tempat gelap dan suhu rendah. Larutan kerja AO 1×10^{-3} M dibuat dengan memasukkan 5,00 mL larutan AO 5×10^{-3} M ke dalam labu ukur 25 mL dan diencerkan dengan etanol sampai tanda batas.

Pembuatan larutan pencuci KH_2PO_4

Padatan KH_2PO_4 sebanyak 1,36 g dilarutkan dalam 100 mL akuabides. Kemudian larutan tersebut diencerkan sampai volume 1000 mL. Larutan pencuci 0,999 M tersebut disimpan pada botol gelap. Pencucian dengan menggunakan larutan pencuci KH_2PO_4 diharapkan mampu mencegah kontaminasi surfaktan pada alat gelas yang dipergunakan.

Penentuan Kondisi Optimum Analisis

Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada konsentrasi SDBS 0,800; 1,20 dan 1,60 mg/L. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang sekitar 350 - 600 nm kemudian dicari absorbansi maksimumnya.

Penentuan pelarut *acridine orange*

Pelarut yang tepat untuk melarutkan *acridine orange* dilakukan dengan variasi pelarut yaitu air dan etanol. Padatan AO sebanyak 0,0663 g dilarutkan ke dalam masing-masing pelarut sebanyak 10,0 mL. Larutan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan diencerkan sampai tanda batas dan terbentuk larutan AO 5×10^{-3} M dalam pelarut air dan etanol. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dari sampel yang direaksikan menggunakan kedua larutan *acridine orange* yang dilarutkan pada pelarut yang berbeda.

Penentuan konsentrasi acridine orange

Setelah ditemukan pelarut yang sesuai untuk padatan *acridine orange*, kemudian konsentrasi *acridine orange* yang tepat ditentukan dengan melakukan variasi konsentrasi larutan *acridine orange*. Variasi larutan AO dibuat dengan konsentrasi 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} , 5×10^{-4} dan 1×10^{-3} M. Kemudian larutan AO berbagai konsentrasi dipakai dalam pembentukan pasangan ion DBS-AO melalui proses ekstraksi. Setelah diukur absorbansinya pada panjang maksimum maka diketahui konsentrasi AO yang memberikan absorbansi paling tinggi, dan konsentrasi tersebut dipakai untuk proses analisis selanjutnya. Volume larutan AO yang dipakai dalam proses analisis juga ditentukan dengan membuat variasi volume AO sebesar 100, 150 dan 200 μL .

Penentuan pH larutan

Penentuan pH dilakukan dengan variasi volume asam asetat glasial yang dipakai dalam proses analisis dilakukan untuk menentukan pH analisis. Variasi volume asam asetat glasial sebesar 20, 100, 150 dan 200 μL .

Penentuan *operating time* pasangan ion DBS-AO

Penentuan *operating time* optimum pasangan ion DBS-AO dilakukan dengan mengukur absorbansi dari larutan standar SDBS dengan konsentrasi 0,800 mg/L. Pengukuran absorbansi sampel dilakukan selama 90 menit dengan selang pengukuran setiap 10 menit.

Proses analisis SDBS dengan spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 10,0 mL sampel yang mengandung SDBS ditambah dengan AO dan asam asetat glasial masing-masing 100 μL . Pasangan ion DBS-AO yang terbentuk ditambah dengan 5,00 mL toluene dan diekstraksi di dalam corong pisah. Campuran larutan kemudian digojok 1 menit dan didiamkan 5 menit, fase organiknya diambil dan didiamkan selama *operating time* lalu diukur pada panjang gelombang maksimum.

Validasi Metode Analisis

Pembuatan kurva standar

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan menggunakan metode yang telah didapat setelah melakukan optimasi. Seri larutan standar berbagai konsentrasi diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang optimum dan *operating time* optimum. Seri larutan standar yang digunakan adalah 0,40; 0,80; 1,60; 3,20; 4,00 dan 6,00 mg/L.

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi dilakukan dengan melakukan pengukuran pada 10 seri larutan blangko. Larutan blangko dibuat sesuai prosedur

ekstraksi, lapisan organik diambil dan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis. Sebanyak 10 seri larutan blanko diukur absorbansinya lalu didapatkan standar deviasi dari blanko. Nilai batas deteksi dan batas kuantifikasi dihitung berdasarkan standar deviasi dari 10 seri blanko.

Penentuan presisi

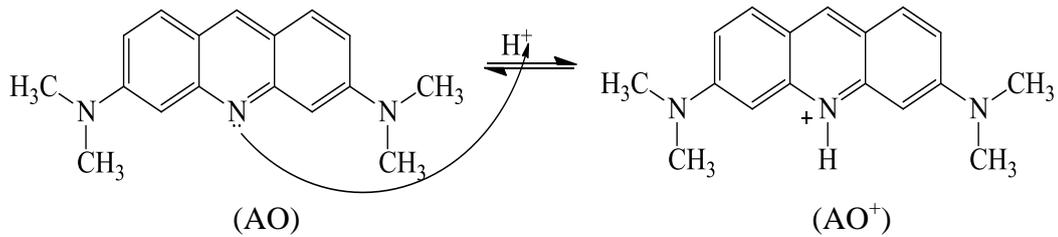
Penentuan presisi dilakukan pada larutan tiga konsentrasi standar SDBS yang berbeda. Proses ekstraksi dilakukan pada masing-masing konsentrasi, kemudian fase organik diambil dan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Penentuan presisi *intraday* dan *interday* dilakukan dengan tiga kali pengulangan pada setiap konsentrasi.

Penentuan persen perolehan kembali

Proses isolasi surfaktan anionik SDBS dilakukan dengan menggunakan ekstraksi Soxhlet. Ikan lele dipisahkan menjadi 4 bagian, lalu dipotong kecil dan dihaluskan dengan *blender*. Sampel ikan lele yang telah halus di *spike* dengan standar SDBS. Ikan lele pada setiap bagian tersebut dipisahkan menjadi 3 bagian lagi dan ditimbang. Larutan SDBS kemudian diratakan dengan sampel ikan lele lalu sampel ikan dibekukan pada lemari pendingin selama 24 jam. Sampel beku tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *freeze dryer* hingga kering dan beratnya konstan. Sampel yang telah di *freeze dry* tersebut ditimbang dan dihaluskan lagi dengan *blender* kemudian dibungkus kertas saring. Sampel yang telah dibungkus kertas saring dimasukkan ke dalam kolom ekstraksi. Sampel ikan lele yang sudah siap pada kolom ekstraksi diekstraksi secara Soxhlet dengan menggunakan n-heksana sebanyak 150 mL selama 9 jam dan kemudian diikuti dengan metanol sebanyak 150 mL selama 6 jam. Ekstrak kemudian di evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga metanol habis. Residu yang didapat lalu dilarutkan kembali dalam akuabides hangat pada labu ukur 100 mL kemudian diencerkan sampai tanda batas. Sampel yang sudah didapatkan kemudian diekstraksi dan fase organiknya dianalisis dengan menggunakan metode spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum.

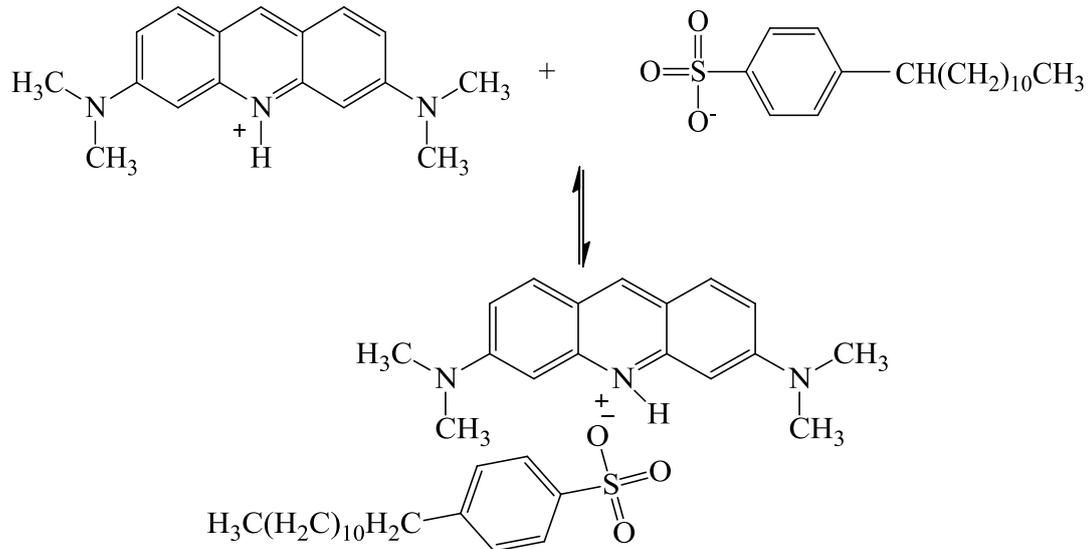
PEMBAHASAN

Prinsip dasar pada analisis *sodium dodecylbenzenesulfonate* (SDBS) di dalam ikan lele ini adalah pembentukan pasangan ion antara surfaktan anionik DBS dengan pereaksi *acridine orange* (AO). Mekanisme reaksi pembentukan pasangan ion yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Mekanisme pembentukan gugus AO bermuatan positif (Falcone *et al.*, 2002).

Pasangan ion terbentuk dari interaksi elektrostatis antara DBS dan AO. Senyawa AO bereaksi dengan H^+ yang berasal dari asam asetat glasial sehingga membentuk AO^+ . AO^+ berinteraksi dengan senyawa DBS sehingga membentuk pasangan ion DBS-AO.



Gambar 2. Reaksi pembentukan pasangan ion antara surfaktan-AO.

Pasangan ion DBS-AO sukar larut dalam air sehingga dapat dipisahkan dari air. Pasangan ion tersebut sukar larut dalam air sebab pasangan ion DBS-AO mempunyai struktur yang besar dan mengandung komponen-komponen yang bersifat hidrofobik. Komponen hidrofobik seperti rantai hidrokarbon sukar larut ke dalam air (Knepper *et al.*, 2003). Adanya gugus benzena juga menurunkan kelarutan senyawa dalam air karena benzena bersifat hidrofobik (Graziano, 1999). Struktur pasangan ion yang besar menyebabkan air sukar mensolvasi pasangan ion DBS-AO. Besarnya struktur suatu senyawa berpengaruh terhadap entalpi, yang berpengaruh terhadap energi solvasi (Graziano, 1999). Pemisahan pasangan ion DBS-AO dari air dilakukan dengan proses ekstraksi cair-cair. Penambahan larutan toluena ke dalam pasangan ion DBS-AO dilakukan sebelum melakukan penggojokkan dengan corong pisah. Toluena digunakan sebagai pelarut karena mempunyai toksisitas yang lebih rendah dibandingkan dengan kloroform (Adak *et al.*, 2005). Pada ekstraksi dalam sistem larutan terbentuk dua fasa, yaitu fasa organik dan fasa air. Fasa organik yang merupakan toluena terdapat dibagian atas dan fasa

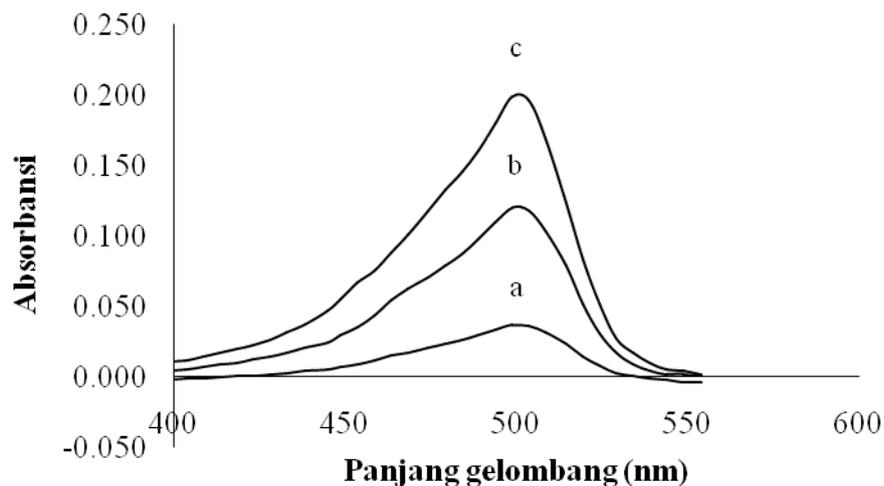
air terletak dibagian bawah. Fasa organik terletak dibagian atas karena pelarut organik toluena mempunyai berat jenis yang lebih rendah dari pada air, yaitu sebesar 0,87 Kg/L.

Penentuan Kondisi Optimum Analisis

Kondisi optimum analisis meliputi penentuan panjang gelombang maksimum, pelarut untuk *acridine orange*, penentuan konsentrasi *acridine orange* yang dipakai saat analisis dan penentuan *operating time*, hasil optimasinya adalah:

Panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum dari suatu senyawa sangat karakteristik karena dipengaruhi oleh struktur dari senyawa tersebut. Oleh karena itu, panjang gelombang maksimum dari senyawa pasangan ion DBS-AO perlu ditentukan. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menentukan serapan optimum dari pasangan ion DBS-AO. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan tiga variasi konsentrasi DBS, yaitu pada konsentrasi 0,80; 1,20 dan 1,60 mg/L. Spektra UV-Vis dari pasangan ion DBS-AO pada panjang gelombang 300 - 600 nm disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektra UV-Vis pasangan ion DBS-AO pada konsentrasi a = 0,80 mg/L, b = 1,20 mg/L, c=1,6 mg/L.

Berdasarkan Gambar 3 absorbansi meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi dan panjang gelombang maksimum dari pasangan ion DBS-AO terletak pada panjang gelombang 499 nm. Serapan pada panjang gelombang 499 nm merupakan serapan pada daerah sinar tampak (*visible*). Serapan ini dihasilkan dari transisi elektron pada pasangan ion DBS-AO yaitu transisi elektronik dari $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$. Transisi elektronik dari masing-masing senyawa berwarna sangat karakteristik (Pavia *et al.*, 2001). Berdasarkan Gambar 3 spektra UV-Vis melebar yang disebabkan terjadinya pembagian

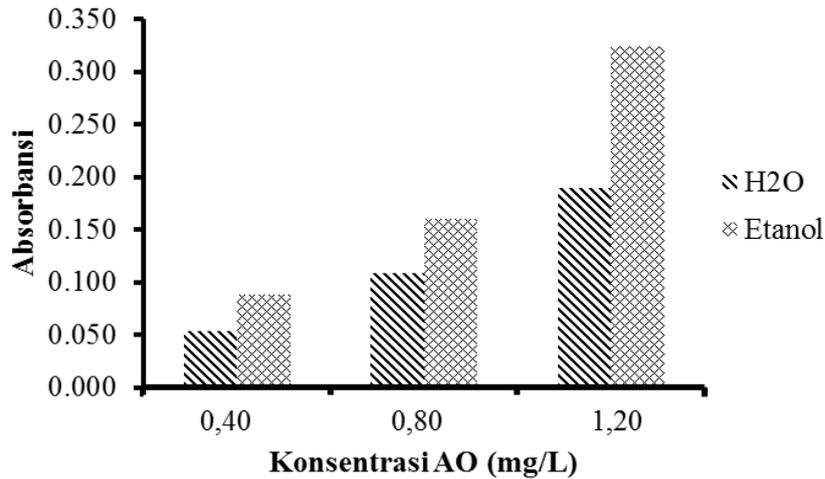
keadaan dasar dan keadaan tereksitasi suatu molekul ke dalam subtingkat-subtingkat rotasi dan vibrasi. Transisi elektronik dapat terjadi dari berbagai subtingkat keadaan dasar menuju ke berbagai subtingkat pada keadaan eksitasi. Transisi elektronik dari subtingkat yang berbeda menyebabkan perbedaan energi sehingga menyebabkan perbedaan panjang gelombang absorpsi yang menyebabkan spektra menjadi lebar (Supratman, 2010).

Panjang gelombang maksimum yang didapatkan berbeda dengan panjang gelombang maksimum dari pasangan ion yang terbentuk antara DS-AO yaitu sebesar 467 nm (Adak *et al.*, 2005). Perbedaan ini kemungkinan karena perbedaan struktur dari DS dan DBS, dimana didalam struktur DBS terdapat benzena sedangkan pada DS tidak. Jumlah ikatan rangkap konjugasi serta gugus aromatik pada pasangan ion berpengaruh terhadap serapan pasangan ion tersebut. Semakin besar jumlah ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus aromatik semakin mudah terjadinya transisi elektron, energi transisi elektron lebih kecil dan panjang gelombang semakin besar (Pudjaatmaka, 1992).

Penentuan pelarut untuk *acridine orange*

Gambar 4 menunjukkan bahwa AO yang dilarutkan ke dalam etanol memberikan absorpsi yang lebih besar dibandingkan AO yang dilarutkan ke dalam air. Hal ini karena berdasarkan hasil pengamatan AO dapat terlarut sempurna di dalam etanol dan tidak larut sempurna di dalam air. Optimasi dilakukan pada konsentrasi 0,40; 0,80 dan 1,20 mg/L. Dari Gambar 4 dilihat bahwa absorpsi pasangan ion DBS-AO meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi.

Pada penggunaan air sebagai pelarut, padatan AO tidak dapat terlarut secara sempurna, namun ketika padatan AO dilarutkan ke dalam etanol, padatan AO dapat terlarut secara sempurna. AO merupakan senyawa organik yang dapat larut dalam pelarut organik, berdasarkan strukturnya AO mengandung dua gugus benzena. Gugus benzena bersifat hidrofobik (Graziano, 1999) dan bersifat nonpolar (Ewell *et al.*, 1944). Struktur AO yang mengandung gugus yang bersifat non polar menyebabkan kelarutan AO di dalam air yang bersifat polar rendah. Berdasarkan hasil pengamatan AO dapat larut dalam etanol karena polaritas etanol yang lebih rendah dibandingkan dengan air (polaritas etanol: 4,3 dan air: 10,2). Meskipun demikian AO dapat larut di dalam air meskipun tidak sempurna karena AO mengandung gugus piridin yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan air, elektron bebas pada nitrogen dapat berikatan dengan H pada air (Schlucker *et al.*, 2001).

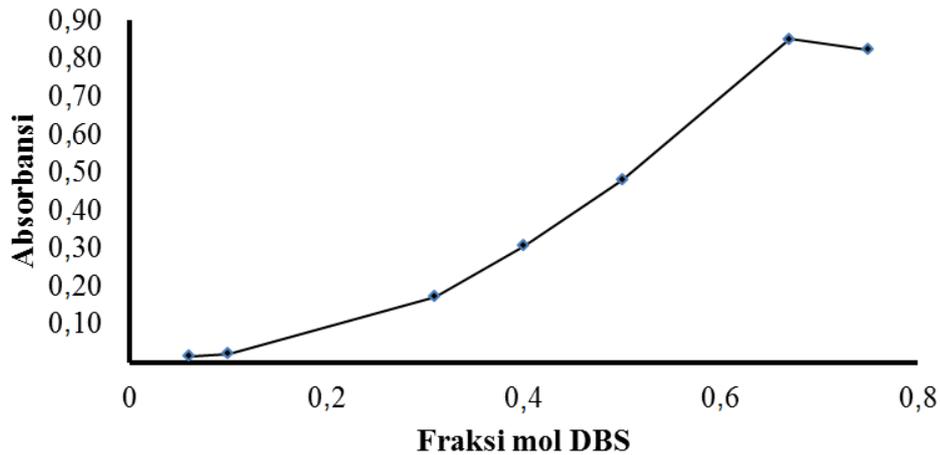


Gambar 4. Pengaruh pelarut terhadap absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis.

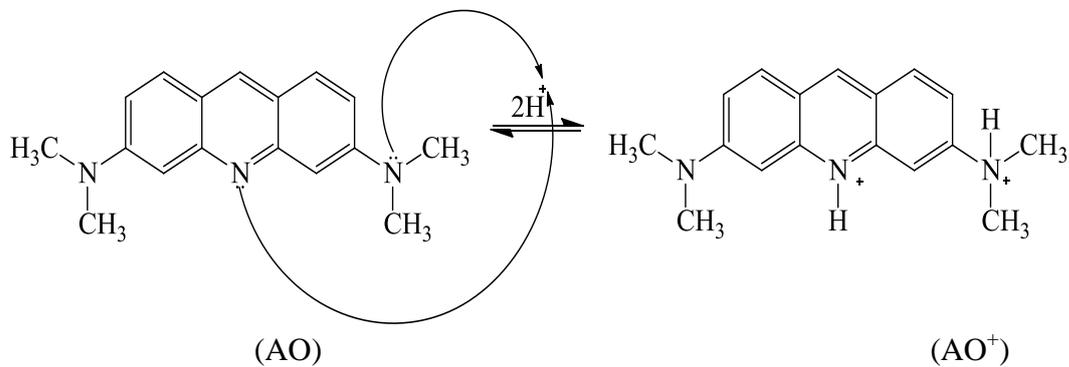
Penggunaan pelarut etanol dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Adak *et al.* (2005) yang menggunakan air sebagai pelarut AO. Perbedaan pelarut AO ini berpengaruh terhadap sensitivitas dari metode analisis. Berdasarkan nilai kemiringan kurva standar sensitivitas metode dengan menggunakan air sebagai pelarut AO lebih rendah dibandingkan dengan penggunaan etanol sebagai pelarut AO. Hal ini dikarenakan AO larut sempurna ke dalam etanol sehingga molekul AO yang dapat berinteraksi dengan DBS lebih banyak sehingga menghasilkan pasangan ion DBS-AO yang lebih banyak.

Fraksi mol DBS

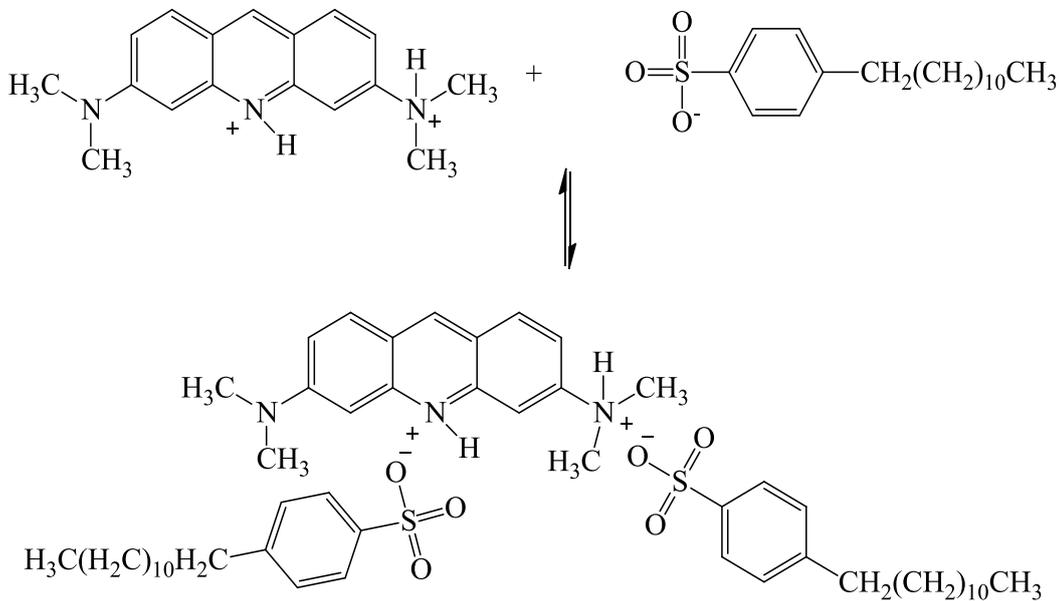
Penentuan fraksi mol DBS diawali dengan optimasi konsentrasi larutan AO untuk mendapatkan konsentrasi AO optimum yang digunakan dalam pembentukan pasangan ion DBS-AO. Optimasi dilakukan pada tiga konsentrasi SDBS yaitu 0,80; 1,20 dan 1,60 mg/L. Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi AO optimum sebesar 1×10^{-3} M. Peningkatan absorbansi disebabkan oleh peningkatan jumlah AO dalam larutan. Peningkatan jumlah AO menyebabkan peningkatan jumlah pasangan ion DBS-AO yang terbentuk. Pada konsentrasi lebih dari 1×10^{-3} M terjadi penurunan absorbansi yang disebabkan oleh kelebihan AO dalam larutan. Kelebihan AO dalam larutan menyebabkan terbentuknya AO dimer. Terbentuknya AO dimer menyebabkan interaksi AO dan DBS menjadi terhambat. Falcone *et al.* (2002) menyatakan bahwa pada konsentrasi lebih dari 1×10^{-3} M, AO mempunyai kecenderungan membentuk AO dimer. Terhambatnya interaksi DBS dan AO menyebabkan absorbansi yang terukur rendah. Berdasarkan data dapat disimpulkan konsentrasi optimum AO yang dibutuhkan adalah 1×10^{-3} M. Jumlah volume AO yang dipakai dalam menentukan fraksi mol DBS adalah sebesar 100 μ L.



Gambar 5. Absorbansi pasangan ion DBS-AO sebagai fungsi fraksi mol DBS.



Gambar 6. Mekanisme pembentukan gugus bermuatan positif AO dan asam asetat glasial.

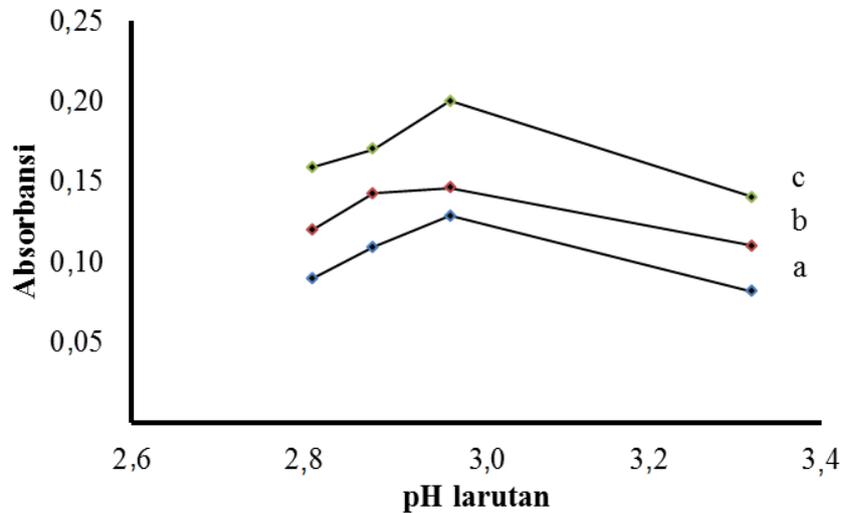


Gambar 7. Reaksi pembentukan pasangan ion DBS-AO.

Penentuan pH Analisis

Besarnya nilai pH yang digunakan dalam proses analisis harus dikontrol. Keadaan analisis harus berlangsung pada suasana asam. Nilai pH dikontrol dengan menambahkan larutan asam asetat glasial pekat dengan volume tertentu. Variasi volume asam asetat

glasial dilakukan pada tiga seri larutan standar SDBS, yaitu pada konsentrasi 0,80; 1,20 dan 1,60 mg/L. Berdasarkan perhitungan diperoleh nilai pH larutan. Perubahan absorbansi pasangan ion DBS-AO terhadap pH larutan disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Pengaruh pH larutan terhadap absorbansi pasangan ion DBS-AO pada konsentrasi DBS a = 0,80 mg/L, b = 1,20 mg/L, c = 1,60 mg/L.

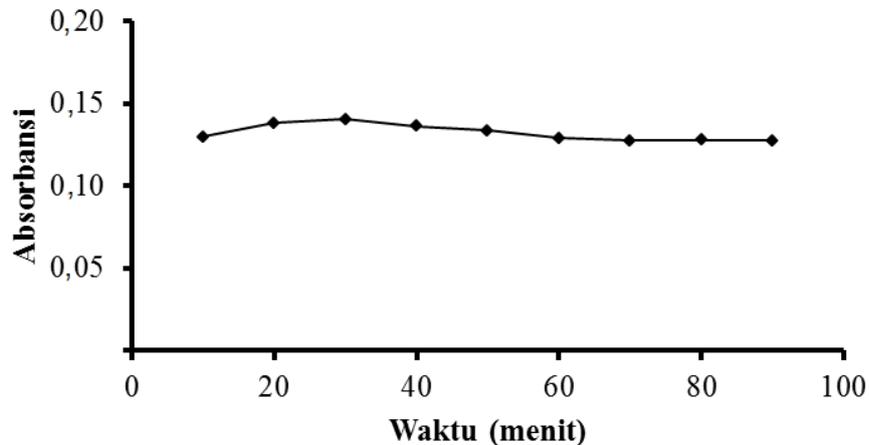
Berdasarkan Gambar 8 absorbansi maksimum terletak pada pH mendekati 3, yaitu 2,97 larutan. Reaksi pembentukan pasangan ion oleh AO cenderung optimum pada pH kurang dari 3 (Pal *and* Bandyopadhyay, 2000). Pada pH yang lebih tinggi akan menyebabkan AO tidak bisa diekstraksi. Oleh karena itu, reaksi dilakukan pada penambahan asam asetat glasial sebanyak 100 μ L agar larutan berada pada pH kurang dari 3. Asam asetat glasial sendiri berfungsi sebagai pengasam atau sumber H^+ dalam reaksi yang terjadi antara DBS dan AO.

Penentuan *operating time* pasangan ion DBS-acridine orange (AO)

Waktu pembentukan pasangan ion yang terbentuk dari reaksi antara DBS-AO dapat dilihat pada Gambar 9. Berdasarkan grafik terlihat bahwa absorbansi pasangan ion DBS-AO relatif stabil. Kestabilan terus berlangsung hingga menit ke-90. Berdasarkan kestabilan pasangan ion DBS-AO yang terbentuk, maka analisis fase organik dilakukan pada rentang waktu tersebut. Hal ini bertujuan agar konsentrasi yang terukur adalah konsentrasi ketikapasangan ion sudah terbentuk, pasangan ion yang stabil membentuk warna orange jernih.

Kestabilan pasangan ion DBS-AO dapat dipengaruhi oleh adanya sinar *visible*. Freifelder *et al.* (1961) menyatakan bahwa radiasi sinar tampak akan menurunkan intensitas warna yang terbentuk oleh pasangan ion AO. Agar stabilitas pasangan ion dapat

bertahan lama maka fasa organik DBS-AO hasil ekstraksi harus ditempatkan pada tempat gelap agar tidak terdegradasi.

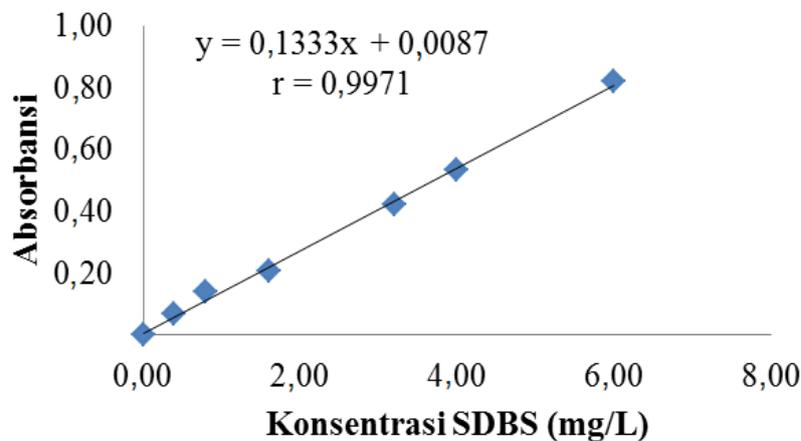


Gambar 9. Waktu kestabilan pasangan ion DBS-AO.

Validasi metode analisis

Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan pada keadaan optimum. Batas bawah konsentrasi yang membentuk kurva standar linear terletak pada konsentrasi 0,20 mg/L, sedangkan batas atas terletak pada konsentrasi 6,00 mg/L.



Gambar 10. Kurva standar larutan surfaktan SDBS.

Berdasarkan analisis pendahuluan tersebut maka kurva standar dibuat pada konsentrasi di daerah linear. Linearitas ditentukan berdasarkan kurva standar yang terbentuk dari hubungan antara konsentrasi SDBS (x) dan absorbansi rata-rata pasangan ion (y). Data hasil analisis dan kurva standar dapat dilihat pada Gambar 10.

Dari kurva pada Gambar X diketahui bahwa absorbansi pasangan ion semakin meningkat seiring dengan kenaikan konsentrasi larutan standar SDBS. Keadaan ini sesuai dengan hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa absorbansi sebanding dengan konsentrasi. Berdasarkan data hasil absorbansi maka didapatkan sebuah persamaan regresi

linear $y = 0,133x + 0,008$. Berdasarkan kurva standar nilai kemiringan (*slope*) dan intersepnya adalah 0,133 dan 0,008. Kurva standar dapat memberikan nilai koefisien korelasi (*r*) yang menunjukkan linearitas. Nilai *r* dari kurva standar tersebut adalah 0,997. Nilai *r* dari kurva standar tersebut sudah mendekati 1, mendekati garis lurus (linear). Sesuai dengan pernyataan Harris (2010), kurva standar dikatakan linear apabila *r* lebih dari atau sama dengan 0,995. Nilai *r* dari kurva standar menunjukkan reliabilitas dari suatu metode analisis, semakin nilai *r* mendekati 1 maka metode analisis semakin reliabel.

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dihitung berdasarkan pengukuran 10 blanko (Harvey, 2000). Besar nilai LOD dapat dihitung berdasarkan rumus perhitungan pada persamaan (1).

$$LOD = \frac{3Sb}{kemiringan} \dots\dots\dots (1)$$

Standar deviasi yang digunakan adalah standar deviasi dari 10 blanko. Harga LOQ juga ditentukan berdasarkan harga standar deviasi 10 blanko, harga LOQ dapat ditentukan berdasarkan persamaan (2).

$$LOQ = \frac{10Sb}{kemiringan} \dots\dots\dots (2)$$

Berdasarkan hasil perhitungan, nilai batas deteksi dan nilai batas kuantifikasi metode analisis surfaktan SDBS adalah sebesar 0,0343 mg/L dan 0,104 mg/L. Batas deteksi memberikan batasan konsentrasi terendah yang memberikan respon yang cukup signifikan dibandingkan dengan blanko. Pada metode ini batas deteksinya adalah 0,0343 mg/L. Konsentrasi suatu analit dapat dideteksi dengan penelitian ini apabila konsentrasinya $\geq 0,0343$ mg/L. Batas kuantifikasi merupakan konsentrasi dimana analit memenuhi kriteria ketepatan, pada metode analisis ini batas kuantifikasinya sebesar 0,104 mg/L. Konsentrasi di bawah 0,104 mg/L tidak menghasilkan ketelitian yang baik. Nilai batas deteksi setelah dilakukan optimasi pada penelitian ini lebih baik dibandingkan dengan batas deteksi dari analisis DBS dengan *methylene blue* yang dilakukan oleh Jurado *et al.* (2006), dimana batas deteksi yang diperoleh sebesar 0,22 mg/L.

Sensitivitas

Hasil analisis memberikan persamaan regresi linear $y = 0,133x + 0,008$, dengan nilai $r = 0,997$. Besarnya sensitivitas dapat diukur dengan menggunakan persamaan 3 sebagai berikut:

$$\text{Persamaan } \varepsilon = \frac{m}{b} \dots\dots\dots (3)$$

Berdasarkan perhitungan di dapatkan harga sensitivitas sebesar $4,64 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Berdasarkan pengelompokan kriteria sensitivitas menurut Savin (1979), nilai sensitivitas dikelompokkan menjadi:

- rendah : $\varepsilon < 2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- sedang : $\varepsilon = 2-6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
- tinggi : $\varepsilon > 6 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa metode ini mempunyai kategori sensitivitas sedang. Meskipun sedang, sensitivitas metode ini lebih baik dibandingkan metode pengukuran surfaktan yang dilakukan oleh Adak *et al.* (2005).

Presisi

Pada penelitian ini, penentuan presisi dilakukan berdasarkan keterulangan (*repeatability*). Keterulangan (*repeatability*) merupakan tingkatan presisi yang sering digunakan (Syarief, 2007). Keterulangan (*repeatability*) yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama. Pada penelitian ini, penentuan presisi dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda.

Penentuan presisi dilakukan pada konsentrasi standar SDBS terendah, menengah dan tertinggi pada kurva standar. Pemilihan tiga konsentrasi ini bertujuan untuk mengetahui sejauh mana metode ini memberikan hasil presisi yang baik pada setiap rentang konsentrasi. Untuk mengetahui hal ini maka penentuan presisi dilakukan pada konsentrasi 0,40; 2,40 dan 6,00 mg/L. Penentuan presisi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan di hari yang sama (*intraday*) dan tiga kali pengulangan pada tiga hari yang berbeda (*interday*) pada setiap konsentrasi standar SDBS. Data perhitungan presisi dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Hasil perhitungan untuk penentuan keterulangan pada hari yang sama (*intraday precision*) pada Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai RSD pada masing-masing konsentrasi $< 2 \%$. Hasil perhitungan untuk keterulangan pada hari yang berbeda (*interday precision*) dari Tabel 2 menunjukkan harga RSD $< 2 \%$. Menurut ICH dalam Gandjar *and* Rohman (2007), suatu metode dikatakan teliti apabila mempunyai nilai standar deviasi relatif (RSD) kurang dari 2 %. Berdasarkan hasil perhitungan maka dapat dikatakan bahwa metode analisis ini mempunyai ketelitian yang lebih rendah dari pada RSD dari analisis DBS menggunakan *metylene biru* yang besarnya $< 0,1160 \%$ (Jurado *et al.*, 2006), tetapi masih

lebih baik dibandingkan dengan RSD dari analisis dengan menggunakan *ethyl violet* yang besarnya $> 2\%$ (Yamamoto *and* Motomizu, 1987).

Tabel 1. Data hasil perhitungan keterulangan pada hari yang sama (*intraday precision*).

Analit	Pengulangan ke	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	Konsentrasi rata-rata	SD	RSD (%)
A	1	0,0646	0,4255	0,4334	0,0077	1,784
	2	0,0667	0,4409			
	3	0,0657	0,4336			
B	1	0,3481	2,5027	2,5317	0,0265	1,045
	2	0,3478	2,5545			
	3	0,3456	2,5380			
C	1	0,8400	6,2556	6,2178	0,0748	1,204
	2	0,8414	6,2662			
	3	0,8235	6,1316			

Tabel 2. Data hasil perhitungan keterulangan pada hari yang berbeda (*interday precision*)

Analit	Pengulangan ke-	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	Konsentrasi rata-rata	SD	RSD(%)
A	1	0,0767	0,5165	0,5129	0,0070	1,370
	2	0,0751	0,5048			
	3	0,0768	0,5174			
B	1	0,3222	2,3621	2,3719	0,0091	0,3822
	2	0,3245	2,3801			
	3	0,3237	2,3734			
C	1	0,8163	6,0774	6,0552	0,0747	1,234
	2	0,8023	5,9719			
	3	0,8215	6,1163			

Akurasi

Penentuan nilai akurasi (ketepatan) pada penelitian ini dilakukan dengan menentukan persentase perolehan kembali. Menurut Gandjar *and* Rohman (2007), akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan nilai analit yang terukur dengan nilai yang diterima. Pada penelitian ini, penentuan akurasi dilakukan dengan *spiking* larutan standar SDBS yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam sampel ikan lele yang akan diekstrak. Penentuan akurasi dilakukan dengan menambahkan 0,40 mL; 2,40 mL dan 6,00 mL larutan standar SDBS dengan konsentrasi 100 mg/L. Penentuan nilai akurasi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan proses yang sama pada masing-masing konsentrasi.

Berdasarkan hasil perhitungan pada Tabel 3 dapat dilihat bahwa nilai persen perolehan kembali DBS adalah sebesar 82,11 - 100,3%. Besarnya persen perolehan

kembali disimpulkan cukup baik. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Harmita (2004) yang mengatakan bahwa analit yang besarnya kurang dari 1 mg/L mempunyai rata-rata persen perolehan kembali sekitar 80 - 110 %. Besarnya nilai persen perolehan kembali dari hasil analisis SDBS dalam sampel ikan lele dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis mempunyai ketepatan yang baik.

Tabel 3. Pengukuran persen perolehan kembali analisis SDBS.

Analit	C _A (mg/L)	Absorbansi			Absorbansi rata-rata	C _S (mg/L)	Perolehan kembali (%)
		I	II	III			
A	0,40	0,0656	0,0678	0,0697	0,0677	0,4489	83,65
		0,0764	0,0748	0,0782	0,0765	0,5148	100,1
		0,0764	0,0738	0,0704	0,0736	0,4929	94,65
B	2,40	0,3511	0,3386	0,3401	0,3432	2,5207	100,3
		0,2926	0,2878	0,2894	0,2899	2,1198	83,56
		0,3297	0,3236	0,3204	0,3246	2,3802	94,41
C	6,00	0,7647	0,7600	0,7569	0,7605	5,6582	92,39
		0,6784	0,6783	0,6785	0,6784	5,0407	82,11
		0,6924	0,6935	0,6917	0,6925	5,1468	83,87

KESIMPULAN

Analisis SDBS menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan pereaksi *acridine orange* (AO) dilakukan pada panjang gelombang 499 nm, dengan pelarut etanol untuk melarutkan AO, perbandingan mol DBS-AO adalah 2 : 1, serta pH analisis sebesar 2,97. Metode analisis SDBS secara spektrofotometri UV-Vis dengan pereaksi AO memberikan koefisien korelasi (r) sebesar 0,997, batas deteksi 0,0343 mg/L, batas kuantifikasi 0,104 mg/L, sensitivitas $4,64 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, presisi < 2 % dan akurasi 82,11 - 100,3 %.

DAFTAR PUSTAKA

- Adak, A., Pal, A., and Bandyopadhyay, M., 2005. Spectrophotometric Determination of Anionic Surfactants in Wastewater using Acridine Orange. *Indian Journal of Chemical Technology* 12, 145-148.
- Anonim, 2002. *Hazardous Substance Fact Sheet, New Jersey Department of Health and Senior Service*. <<http://www.nj.gov/health/>> (diakses pada 18 Agustus 2014).
- Datta, S., Loyo-Rosales, J.E., and Rice, C.P., 2002. A Simple Method for Determination of Trace Levels of Alkylphenolic Compounds in Fish Tissue using Pressurized Fluid Extraction, Solid Phase Cleanup, and High-Performance Liquid Chromatography Fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1350-1354.

- Ewell, R.H., Berg, L and Horrison, J.M., 1944. Azeotropic Distillation. *Industrial & Engineering Chemistry* 36(10), 871-875.
- Falcone, R.D., Correa, N.M., Biastutti, M.A., and Silber, J.J, 2002. Acid-Base and Aggregation Processes of Acridine Orange Base in n-Heptane/AOT/Water Reverse Micelles. *Langmuir* 18, 2039-2047.
- Freifelder, D., Davison, P.F, and Geiduschek, E.P., 1961. Damage By Visible Light to The Acridine Orange-DNA Complex. *Biophysical Journal* 1, 389-400.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Graziano, G., 1999. Hydrophobicity of Benzene. *Biophysical Chemistry* 82, 69-79.
- Harmita, 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode and Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 1(3), 117-135.
- Harris, D.C., 2010. *Quantitative Chemical Analysis*. W.H. Freeman and Company. New York.
- Harvey, D., 2000. *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill Companies, Inc., USA.
- Jurado, E., Fernandez-Serrano, M., Nunez-Olea, J., Luzon, G. and Lechuga, M., 2006. Simplified Spectrophotometric Method using Methylene Blue for Determining Anionic Surfactant: Applications to the Study of Primary Biodegradation in Aerobic Screening Tests. *Chemosphere* 65, 278-285.
- Knepper, T.P., Barcelo, D., and Voogt, P.D., 2003. *Analysis and Fate of Surfactants in The Aquatic Environment*. Elsevier Science B.V., Netherlands.
- Ogeleka, D.F., Ezemoye, L.I., and Okieimen F.E., 2010. Sublethal Effects of Industrial Chemicals on Fish Fingerlings (*Tilapia guineensis*). *African Journal of Biotechnology* 12(9), 1839-1843.
- Pal, A., and Bandyopadhyay, M., 2000. Solven Extraction-Spectrofluorometric Determination of Anionic Surfactant using Acridine Orange. *Indian Journal of Chemical Technology* 7,105-108.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., and Vyvyan, J.R., 2001. *Introduction to Spectroscopy*. Western Washington University. Washington.
- Pudjaatmaka, A.H., 1992. *Analisis Kimia Kuantitatif* (diterjemahkan dari Day, R.A. and Underwood, A.L., 1989. *Quantitative Analysis*. 5th Ed., Printice-Hall). Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Purba, H., 2014. Validasi Metode Spektrofotometri untuk Analisis Surfaktan Anionik Dodesil Benzena Sulfonat (DBS) dalam Ikan Lele (*Clarias batracus*). *Tesis*. Jurusan Kimia FMIPA UGM. Yogyakarta.
- Rust, D., 2008. *Surfactants: A Market Opportunity Study Update*. OmniTech International Ltd., Midland. MI.
- Saez, M., Leon, V.M., Gomez-Parra, A., and Gonzalez-Mazo, E., 2000. Extraction and Isolation of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Their Intermediate Metabolites from Various Marine Organisms. *Journal of Chromatography A* 889, 99-104.
- Savin, S.B., 1979. Fundamental of Analytical Chemistry. *CRC. Critical Reviews in Analytical Chemistry* 8, 55.

- Schlucker, S., Singh, R.K., Asthana, B.P., Popp, J., and Kiefer, W., 2001. Hydrogen-Bonded Pyridine-Water Complexes Studied by Density Functional Theory and Raman Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A* 105, 9983-9989.
- Sirisattha, S., Momose Y., Kitagawa, E., and Iwahashi, H., 2004. Toxicity of Anionic Detergents Determined by *Saccharomyces cerevisiae* Microarray Analysis. *Water Research* 38, 61-70.
- Supratman, U., 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Widya Padjajaran. Bandung.
- Syarief, W.R., 2007. *Analisis Farmasi: Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi and Praktisi Kimia Farmasi* (diterjemahkan dari Watson, D.G., 2005. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemist*. 2nd Ed., Elsevier Limited. United Kingdom). Penerbit EGC. Jakarta.
- Tajalli, H., Gilani, A.G., Zakerhamidi., and Moghadam, M., 2009. Effects of Surfactants on the Molecular Aggregation of Rhodamine Dyes in Aqueous Solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 72, 697-702.
- Tolls, J., Haller, M., and Sijm, D.T.H.M., 1999. Extraction and Isolation of Linear Alkylbenzenesulfonate and Its Sulfohenylcarboxylic Acid Metabolites from Fish Sample. *Analytical Chemistry* 71, 5242-5247.
- Yamamoto, K., and Motomizu, S., 1987. Solvent Extraction-Spectrophotometric Determination of Anionic Surfactant in Sea Water. *Analyst* 112, 1405-1408.
- Yu, L., Wu, M., Dong, W., Jin, J. and Zhang, X., 2011. Reverse Flow Injection Analysis of Trace Amounts of Anionic Surfactants in Seawater without Liquid-Liquid Extraction. *Soil and Water Research* 4(6), 198-204.