



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE LC-MS/MS UNTUK PENENTUAN SENYAWA
ASAM TRANS, TRANS-MUKONAT, ASAM HIPPURAT, ASAM 2-METIL
HIPPURAT, ASAM 3-METIL HIPPURAT, ASAM 4-METIL HIPPURAT
DALAM URIN SEBAGAI BIOMARKER PAPARAN BENZENA,
TOLUENA, DAN XILENA**

SKRIPSI

**MARIS KARISMA GINTING
0806399792**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE LC-MS/MS UNTUK PENENTUAN SENYAWA
ASAM TRANS, TRANS-MUKONAT, ASAM HIPURAT, ASAM 2-METIL
HIPURAT, ASAM 3-METIL HIPURAT, ASAM 4-METIL HIPURAT
DALAM URIN SEBAGAI BIOMARKER PAPAN BENZENA,
TOLUENA, DAN XILENA**

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**Oleh :
MARIS KARISMA GINTING
0806399792**

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Maris Karisma Ginting

NPM : 0806399792

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Maris Karisma Ginting
NPM : 0806399792
Program Studi : Kimia
Judul Skripsi : Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam trans, trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-metil Hippurat, Asam 3-metil Hippurat, Asam 4-metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Drs. Sunardi, M.Si
Pembimbing II : Prof. Dr. Endang Asijati W, M.Sc
Penguji I : Asep Saefumillah S.Si., M.Si., Ph.D
Penguji II : Prof. Dr. Soleh Kosela, M.Se
Penguji III : Dr. Yoki Yulizar M.Se



(Sunardi)
(Endang Asijati W)
(Asep Saefumillah S.Si., M.Si., Ph.D)
(Soleh Kosela)
(Yoki Yulizar)

Ditetapkan di : Departemen Kimia Universitas Indonesia
Tanggal : 9 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas limpahan berkat dan karunia-Nya selama ini sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta melengkapi tahapan penulisan skripsi ini dengan baik dan tepat waktu. Adapun tujuan penulisan skripsi berjudul "*Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam trans, trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-metil Hippurat, Asam 3-metil Hippurat, Asam 4-metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena*" diajukan sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains dari Departemen Kimia Universitas Indonesia.

Pada kesempatan kali ini, penulis ingin mempersembahkan skripsi ini khusus kepada kedua orang tua penulis yang merupakan dua orang terhebat di dunia ini, yang tiada hentinya memberi dukungan moril dan materil selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Kimia, Universitas Indonesia. Selain itu penulis juga tidak lupa mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Dedy Permana Gunari Sebayang yang selalu memotivasi penulis saat menghadapi kesulitan-kesulitan selama periode perkuliahan dan juga selama periode penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa dorongan dan bimbingan dari berbagai pihak, maka penulis tidak dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini dengan baik dan lancar. Oleh sebab itulah, pada kesempatan ini penulis secara khusus mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah berjasa baik secara langsung maupun tidak langsung membantu dan membimbing penulis selama periode penelitian berlangsung dan juga dalam menyelesaikan skripsi ini. Adapun pihak-pihak tersebut antara lain :

1. Bapak Drs. Sunardi, M.Si selaku pembimbing penelitian dan pembimbing akademik yang selama ini telah membimbing penulis dalam memberikan saran yang sangat membangun seputar masalah akademik. Serta sangat membantu penulis dalam memberi saran dan kritik yang membangun selama penelitian berlangsung serta dalam memberikan dukungan semangat

yang tiada hentinya kepada penulis sehingga penulis dapat menyusun skripsi ini dengan baik.

2. Prof. Dr. Endang Asijati W, M.Sc selaku pembimbing penelitian yang membantu penulis dalam member ilmu, saran, dan kritik yang membangun selama penelitian berlangsung sehingga penulis dapat menyusun skripsi ini dengan baik.
3. Bapak Dr. Ridla Bakri, M.Phil selaku ketua Departemen Kimia Universitas Indonesia.
4. Ibu Dra.Tresye Utari, M.Si selaku koordinator penelitian Departemen Kimia Universitas Indonesia.
5. Kak Zora, Kak Rasyid, Kak Puji, Kak Rispa, Kak Mila, Kak Daniel, Kak Yudi, dan Kak Dio serta seluruh asisten di Laboratorium Afiliasi yang telah banyak membantu penulis selama penelitian berlangsung.
6. Seluruh Staff pengajar Departemen Kimia Universitas Indonesia untuk bekal ilmu yang telah diberikan selama periode perkuliahan berlangsung.
7. Pak Hedi, Mbak Cucu, Mbak Ina, Pak Sutrisno (Babeh), Mbak Eva yang turut membantu penulis selama proses penelitian.
8. Sahabat-sahabatku : Sabet, Sherly, Ralda, Emanuel, Michu, Lintang, Dea, Dinda, Sesin, Yogi, Vivi, Uni Maya, Fina, Frida, Martin, Pipit, Septri, Puthi, Fai, dan semua teman-teman keluarga besar Nonreg 2008 yang sudah penulis anggap sebagai keluarga. Terima kasih atas semua dukungan yang telah diberikan

Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat sebagai sumber referensi yang dapat memberikan banyak informasi kepada para pembaca yang akan melakukan penelitian yang berkaitan dengan instrumentasi. Namun penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan kritik.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maris Karisma Ginting
NPM : 0806399792
Program Studi : Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam trans, trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-metil Hippurat, Asam 3-metil Hippurat, Asam 4-metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 9 Juli 201

Yang menyatakan


(Maris Karisma Ginting)

ABSTRAK

Nama : Maris Karisma Ginting
Program Studi : Kimia
Judul : Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam trans, trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-metil Hippurat, Asam 3-metil Hippurat, Asam 4-metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena

Sebuah metode LC-MS/MS telah dikembangkan dan divalidasi, untuk penentuan simultan dari asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, 2-metil asam hippurat, 3-metil asam hippurat, dan 4 -metil asam hippurat dalam urin manusia sebagai biomarker dari paparan benzena, toluena dan xilena (BTX). Setelah ekstraksi fase padat dan pemisahan LC, sampel dianalisis dengan spektrometer massa triple quadrupole dan dioperasikan dalam mode ion negatif. Metode ini memenuhi kriteria validasi dalam hal linearitas, rentang, presisi, batas deteksi, batas kuantisasi, serta persen perolehan kembali. Diperoleh nilai $R^2 \geq 0,996$ dengan rentang 0 ppm – 1 ppm. Nilai presisi yang dinyatakan dengan %RSD berada pada 0,784 % - 3,272 %. Batas deteksi dari lima analit berkisar antara 0,035 ppm - 0,068 ppm. Batas kuantisasi dari lima analit berkisar antara 0,117 ppm - 0,218 ppm. Persen perolehan kembali mampu mencapai kisaran 85%-99%. Tingkat sensitivitas yang tinggi membuat metode ini cocok untuk pemantauan biologis rutin untuk paparan BTX baik di wilayah kerja maupun lingkungan sekitar. Metode divalidasi diterapkan untuk menilai paparan BTX dalam tubuh 7 orang petugas lalu lintas perkotaan dengan kadar BTX berkisar 0.04 ppm – 46,21 ppm.

Kata Kunci : LC-MS/MS, BTX, trans, trans-mukonat, asam hippurat, 2-metil asam hippurat, 3-metil asam hippurat, dan 4 -metil asam hippurat, optimasi, validasi.

xiii+82 halaman : 27 gambar; 12 tabel; 15 lampiran

Daftar Pustaka : 57 (1986-2011)

ABSTRACT

Name : Maris Karisma Ginting
Study Program : Chemistry
Title : Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of trans, trans-Muconic Acid, Hippuric Acid, 2-methyl Hippuric Acid, 3-methyl Hippuric Acid, 4-methyl Hippuric Acid in Urine as Biomarkers of Exposure to Benzene, Toluene and Xylene

A liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method was developed and fully validated, for the simultaneous determination of trans, trans-muconic acid, hippuric acid, 2-methyl hippuric acid, 3-methyl hippuric acid, and 4-methyl hippuric acid in human urine as biomarkers of exposure to benzene, toluene and xylenes (BTX). After solid phase extraction and LC separation, samples were analyzed by a triple–quadrupole mass spectrometer operated in negative ion mode. This method of validation criteria in terms of linearity, range, precision, detection limits, quantitation limits, and percent recovery. Obtained values $R^2 \geq 0.996$ in the range 0 ppm - 1 ppm. Precision values are expressed as % RSD was at 0.784% - 3.272%. Detection limit of five analytes ranged from 0.02 ppm - 0.038 ppm. Quantitation limit of five analytes ranged from 0.035 ppm - 0.068 ppm. Percent recoveries are able to achieve the range of 85% -99%. Levels of high sensitivity makes this method suitable for routine biological monitoring for exposure to BTX both in the workplace or the environment. Validated method is applied to assess exposure to BTX in the body of urban traffic officer with BTX levels ranging from 0.04 ppm - 46.21 ppm.

Key Words : LC-MS/MS, BTX, trans, trans-muconic acid, hippuric acid, 2-methyl hippuric acid, 3-methyl hippuric acid, and 4-methyl hippuric acid, optimization, validation.

xiii+82 pages : 27 pictures; 12 tables, 15 attachment

Bibliography : 56 (1986-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Perumusan masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	3
1.4 Hipotesis.	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Benzena	4
2.1.1 Sifat fisik dan kimia.	4
2.1.2 Pemantauan di lingkungan kerja.	5
2.1.3 Metabolisme benzena.	5
2.2 Toluena	7
2.2.1 Sifatfisik dan kimia.	7
2.2.2 Pemantauan di lingkungan kerja.	7
2.2.3 Metabolisme toluena	8
2.3 Xilena	10
2.3.1 Sifat fisik dan kimia	11
2.3.2 Pemantauan di lingkungan kerja.	11
2.3.3 Metabolisme xilena	12
2.4 Validasi metode analisis	12
2.4.1 Linearitas dan rentang	13
2.4.2 Kecermatan.	13
2.4.3 Keseksamaan (<i>Precision</i>).	15
2.4.4 Selektivitas	15
2.4.5 Batas deteksi dan batas kuantisasi	16
2.4.6 Ketangguhan metode	17
2.4.7 Kekuatan (<i>Robustness</i>)	17
2.5 <i>Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry</i> (LC-MS/MS)	18
2.5.1 Sumber Ion (<i>Ion Source</i>)	19
2.5.1.1 Ionisasi elektrospray	20
2.5.1.2 Ionisasi kimia tekanan atmosfer	21
2.5.1.3 Photoionisasi tekanan atmosfer	22
2.5.2 Analisis Massa (<i>mass analyzer</i>)	23

2.5.2.1	Quadropole	23
2.5.2.2	<i>Time of flight</i> (TOF)	24
2.5.2.3	Perangkap ion	25
2.5.2.4	<i>Fourier transform-ion cyclotron resonance</i>	26
2.5.3	Penggabungan dengan Metode <i>Liquid Chromatograph</i>	27
2.5.3.1	CID pada satu tahap MS	27
2.5.3.2	CID pada dua tahap MS	28
BAB 3 METODE PENELITIAN		
3.1	Lokasi	30
3.2	Alat dan Bahan	30
3.1.1	Alat	30
3.1.2	Bahan	30
3.3	Kondisi LC-MS/MS	31
3.4	Prosedur penelitian	31
3.4.1	Preparasi larutan baku	31
3.4.2	Preparasi fase gerak	31
3.4.3	Persiapan instrumen LC-MS/MS	32
3.4.4	Optimasi kondisi spektroskopi massa	32
3.4.5	Optimasi kondisi sumber ion	33
3.4.6	Optimasi kondisi kromatografi	33
3.4.7	Validasi standar	33
3.4.7.1	Linearitas	33
3.4.7.2	Akurasi	33
3.4.7.3	Presisi	34
3.4.7.4	Batas deteksi dan batas kuantisasi	34
3.4.8	Pengujian Sampel	34
3.4.8.1	Analisis kualitatif	34
3.4.8.2	Analisis kuantitatif	34
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Pemisahaan tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA	36
4.2	Optimasi kondisi LC-MS/MS	39
4.2.1	Optimasi kondisi spektroskopi massa	39
4.2.2	Optimasi kondisi sumber ion	44
4.2.3	Optimasi kromatografi cair	45
4.3	Metode validasi	48
4.3.1	Linearitas dan rentang	48
4.3.2	Presisi	50
4.3.3	Batas deteksi dan batas kuantisasi	50
4.3.4	Persen perolehan kembali (% <i>recovery</i>)	51
4.4	Analisis ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA pada sampel	52
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan	54
5.2	Saran	55
DAFTAR PUSTAKA		56
LAMPIRAN		62

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Metabolisme benzena	6
Gambar 2.2	Metabolisme toluene	9
Gambar 2.3	Metabolisme xilena	12
Gambar 2.4	Aplikasi dari berbagai teknik ionisasi LC-MS/MS	19
Gambar 2.5	Sumber ion elektropray	20
Gambar 2.6	Desorpsi ion dari larutan	20
Gambar 2.7	Sumber ion APCI	21
Gambar 2.8	Sumber ion APPI	22
Gambar 2.9	Analisis massa quadropole	23
Gambar 2.10	Modus pindai dan SIM	24
Gambar 2.11	Analisis massa <i>time-of-flight</i> (TOF)	25
Gambar 2.12	Analisis massa perangkap ion	26
Gambar 2.13	Analisis massa FT-ICR	26
Gambar 2.14	Analisis massa CID dengan satu quadropole	27
Gambar 2.15	MS/MS dalam spektrometer massa triple-quadropole	28
Gambar 4.1	Perbandingan dua tipe fase gerak	37
Gambar 4.2	Hasil pemisahan metabolit BTX	38
Gambar 4.3	Ion prekursor dan ion produk asam trans, trans-mukonat	41
Gambar 4.4	Ion prekursor dan ion produk asam hippurat	42
Gambar 4.5	Ion prekursor dan ion produk asam 2-metil hippurat	43
Gambar 4.6	Ion prekursor dan ion produk asam 3-metil hippurat	43
Gambar 4.7	Ion prekursor dan ion produk asam 4-metil hippurat	44
Gambar 4.8	Pemisahan dengan elusi isokratik 30 %	46
Gambar 4.9	Grafik gradient eluen asetone nitril 10% - 30%	47
Gambar 4.10	Pemisahan dengan gradien elusi 10%-30% asetone nitril	47
Gambar 4.11	Kurva linearitas ekstraksi asam trans, trans-mukonat	49
Gambar 4.12	Kurva linearitas asam trans, trans-mukonat	49

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Sifat fisik dan kimia benzena	4
Tabel 2.2	Sifat fisik dan kimia toluena	7
Tabel 2.3	Sifat fisik dan kimia xilena	11
Tabel 2.4	Batas perolehan kembali (<i>recovery</i>)	14
Tabel 4.1	Kondisi optimum spectrometer massa	40
Tabel 4.2	Kondisi optimum sumber ion (<i>ion source</i>)	45
Tabel 4.3	Gradien eluen asetronitril 10%-30%	46
Tabel 4.4	Koefisien korelasi dengan maupun tanpa perlakuan ekstraksi	48
Tabel 4.5	Nilai %RSD dengan perlakuan ekstraksi dan tanpa perlakuan ekstraksi	50
Tabel 4.6	Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) standar dengan perlakuan ekstraksi	51
Tabel 4.7	Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) standar tanpa perlakuan ekstraksi	51
Tabel 4.8	Nilai <i>persen recovery</i> sampel	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Grafik linearitas dengan perlakuan ekstraksi pada larutan standar asam trans, trans-mukonat (a), asam hippurat (b), asam 2-metil hippurat (c), asam 3-metil hippurat (d), dan asam 4-metil hippurat (e).	62
Lampiran 2	Grafik linearitas tanpa perlakuan ekstraksi pada larutan standar asam trans, trans-mukonat (a), asam hippurat (b), asam 2-metil hippurat (c), asam 3-metil hippurat (d), dan asam 4-metil hippurat (e).	64
Lampiran 3	Presisi larutan standar asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, asam 4-metil hippurat dengan perlakuan ekstraksi dan tanpa perlakuan ekstraksi	67
Lampiran 4	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) ekstraksi asam trans, trans-mukonat	72
Lampiran 5	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) ekstraksi asam hippurat	73
Lampiran 6	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) ekstraksi asam 2-metil hippurat	74
Lampiran 7	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) ekstraksi asam 3-metil hippurat	75
Lampiran 8	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) ekstraksi asam 4-metil hippurat	76
Lampiran 9	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) asamtrans, trans-mukonat	77
Lampiran 10	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) asam hippurat	78
Lampiran 11	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) asam 2-metil hippurat	79
Lampiran 12	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) asam 3-metil hippurat	80
Lampiran 13	Limit deteksi (LOD) dan limit kuantisasi (LOQ) asam 4-metil hippurat	81
Lampiran 14	Analisis kuantitatif tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA pada urin	82
Lampiran 15	Recovery sampel	82

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Udara merupakan kebutuhan vital manusia untuk bernapas. Tanpa udara, manusia tidak mungkin bisa hidup. Namun, perkembangan dunia industri yang sangat pesat dengan beraneka ragam penggunaan bahan kimia membawa dampak buruk terhadap udara yang kita hirup sehari-hari. Sumber utama pencemaran udara di kota besar berasal dari emisi gas buang kendaraan bermotor.

Ada banyak faktor yang mempengaruhi pencemaran udara dari kendaraan bermotor, antara lain :

1. Meningkatnya kepemilikan kendaraan bermotor
2. Buruknya kualitas bahan bakar minyak (BBM) di Indonesia, ditambah dengan maraknya pengoplosan di SPBU, sehingga menghambat penerapan standar emisi gas buang yang lebih ketat, dan sangat minimnya penggunaan kendaraan teknologi tinggi yang rendah emisi, misal penggunaan *engine management system* dan *catalytic converter*
3. Minimnya perawatan kendaraan bermotor.
4. Kurangnya sarana transportasi umum serta rendahnya kualitas pengolahan sistem transportasi mendorong laju kepemilikan dan penggunaan kendaraan pribadi.
5. Lemahnya penegakan hukum di bidang pencemaran udara.

Bahan bakar kendaraan bermotor berasal dari minyak bumi. Komposisi minyak bumi terdiri dari senyawa hidrokarbon dan senyawa non hidrokarbon seperti sulfur, nitrogen, oksigen dan berbagai logam berat dalam berbagai susunan kombinasi. Senyawa hidrokarbon minyak bumi terdiri dari campuran hidrokarbon cair, gas yang terlarut, dan hidrokarbon padat. Senyawa tersebut tersusun dari beberapa golongan yaitu senyawa alkana (parafinik), sikloalkana, aromatik, dan olifinik.

Benzena, toluena dan xilena isomer (BTX) merupakan senyawa hidrokarbon penyusun minyak bumi. Selain itu, senyawa ini merupakan komponen volatil bensin dan konstituen asap tembakau. BTX terbentuk dihampir

setiap proses pembakaran. Hal ini yang menjadikan BTX sebagai polutan lingkungan yang paling umum ditemui¹.

BTX yang diserap akan diekskresikan melalui ginjal sebagai metabolit, yaitu asam trans,trans-mukonat (tt-MA) untuk benzena^{2,3}, asam hippurat (HA) untuk toluena⁴, dan asam 2-metil hippurat (2-MHA), asam 3-metil hippurat (3-MHA), asam 4-metil hippurat (4-MHA) untuk xilena⁵. Analisis BTX dalam bentuk metabolitnya umumnya dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair.

Kromatografi cair merupakan teknik dasar pemisahan senyawa di bidang ilmu pengetahuan kimia dan bidang terkait lainnya. Kromatografi cair mampu memisahkan senyawa organik dari molekul kecil sampai molekul besar dan rentang yang sangat luas, seperti molekul protein. Detektor yg sering digunakan untuk kromatografi cair ialah UV-Vis dimana data yang dihasilkan mewakili kekuatan signal sebagai fungsi dari waktu dan luas area. Spektrometer massa mampu memberikan data spektra massa suatu senyawa. Hasil ini memberikan informasi yang berharga mengenai struktur, berat molekul, identitas, jumlah, dan kemurnian sampel. Data spektra massa menambahkan kekhususan yang mampu meningkatkan kepercayaan akan hasil yang diperoleh, baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

Pengembangan metode analisa BTX dengan kromatografi cair kinerja tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan gas kromatografi-spektrometri masa (GC-MS) telah menjadi metode yang paling sering dilakukan saat ini karena cukup mudah untuk dioperasikan serta waktu analisisnya yang relatif singkat⁶. Namun untuk memperoleh data dengan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi, *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) saat ini dianggap sebagai pilihan terbaik dalam menganalisa asam fenil merkapturik, asam benzil merkapturik, asam o-metil benzil merkapturik dalam urin manusia sebagai biomarker dari paparan BTX⁷⁻¹³. LC-MS/MS telah digunakan untuk penentuan ketiga senyawa biomarker paparan BTX dilakukan menggunakan fase gerak asam format dan metanol, serta fase diam kolom C18¹⁴. Pada penelitian kali ini akan dilakukan validasi terhadap metode LC-MS/MS untuk penentuan senyawa asam trans, trans-mukonat, asam

hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat dalam urin sebagai biomarker paparan BTX dengan fase diam kolom C18 dan fase gerak asetonitril dan campuran air dengan asam asetat glasial, serta adanya perlakuan modifikasi gradien elusi pada fase gerak. Perlakuan ekstraksi dalam penelitian ini mengikuti prosedur NIOSH 8301 dengan menggunakan ekstraktil etil asetat⁵.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang mendasari penelitian ini adalah karakteristik fragmentasi / dari masing-masing senyawa (tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA) berdasarkan kemampuan analit mengion pada spektrometer massa. Diharapkan pemisahan secara mikro yang dilakukan oleh LC mampu terdeteksi oleh *elektrospray ionization*. Permasalahan lain adalah apakah kondisi optimum LC-MS/MS untuk deteksi senyawa metabolit BTX yang diperoleh dapat memenuhi parameter-parameter validasi atau tidak.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Memperoleh dan mengembangkan kondisi analisa senyawa metabolit BTX dalam urin dengan metode *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).
2. Validasi metode analisa senyawa metabolit BTX yang diperoleh dari kondisi optimum LC-MS/MS untuk membuktikan bahwa metode tersebut telah memenuhi persyaratan untuk analisa selanjutnya.

1.4 Hipotesis

Modifikasi gradien elusi pada kromatografi cair memberikan pemisahan yang baik dengan waktu yang relatif singkat. Fragmentasi / dari ion prekursor dari masing-masing senyawa yang berasal dari deprotonasi ion pada spektrometri massa yang terdapat dalam LC-MS/MS mampu memberikan minimal 2 ion produk yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif yang lebih selektif.

BAB 2


TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Benzena

2.1.1 Sifat Fisik dan Kimia

Benzena merupakan senyawa organik tak berwarna dan mudah terbakar dan memiliki aroma yang menyenangkan. Karena memiliki bau yang menyenangkan benzena dikategorikan sebagai senyawa aromatik dan memiliki rumus molekul C_6H_6 . Rumus molekul benzena memperlihatkan sifat ketakjenuhan dengan adanya ikatan rangkap. Benzena adalah salah satu komponen dalam bensin dan pelarut yang penting dalam dunia industri. *International Agency for Research on Cancer* (IARC) menetapkan benzena sebagai senyawa hidrokarbon aromatik yang karsinogenik¹⁵.

Tabel 2.1. Sifat fisik dan kimia benzena

No.	Sifat Fisik dan Kimia	Keterangan
1.	Rumus molekul	C_6H_6
2.	Rumus bangun	
3.	Keadaan pada suhu ruang	Berbentuk larutan jernih, mempunyai bau khas aromatik
4.	Titik nyala	$-11,1\text{ }^{\circ}C$ (mudah terbakar)
5.	Kelarutan dalam air pada $25\text{ }^{\circ}C$	0,188% (berat/berat) atau 1,8 gr/L
6.	Kelarutan dalam pelarut organik	Alkohol, kloroform, eter, karbon disulfida, aseton, minyak, karbon tetraklorida, asam asetat glasial
7.	Massa molekul relatif	78,11 gr/mol
8.	Batas mudah terbakar	1,3-7,1%
9.	Batas ambang bau	4,8-15 mg/m^3
10.	Titik Leleh	$5,5\text{ }^{\circ}C$

[Sumber: IPCS Inchem¹⁶]

2.1.2 Pemantauan di Lingkungan Kerja

Benzena terdapat di seluruh lingkungan kehidupan. Benzena merupakan senyawa organik alami yang merupakan komponen utama minyak bumi (1-4%)¹⁷ dan dapat ditemukan di air laut (0.8 mg/L) di sekitar area minyak bumi dan gas alam¹⁸. Umumnya manusia terpapar benzen melalui udara pernapasan yang terkontaminasi. Sumber paparan melalui jalur inhalasi terutama berasal dari penguapan benzena dari minyak bumi dan emisi dari asap kendaraan bermotor.

Salah satu pengkajian kriteria kuantitatif suatu paparan dengan maksud menilai akseptibilitas tingkat paparan zat toksik yang terukur di tempat kerja adalah nilai ambang batas. Beberapa lembaga yang mengatur tentang nilai ambang batas tersebut antara lain:

- *Occupational Safety and Health Administration (OSHA)*
- *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*
- *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)*

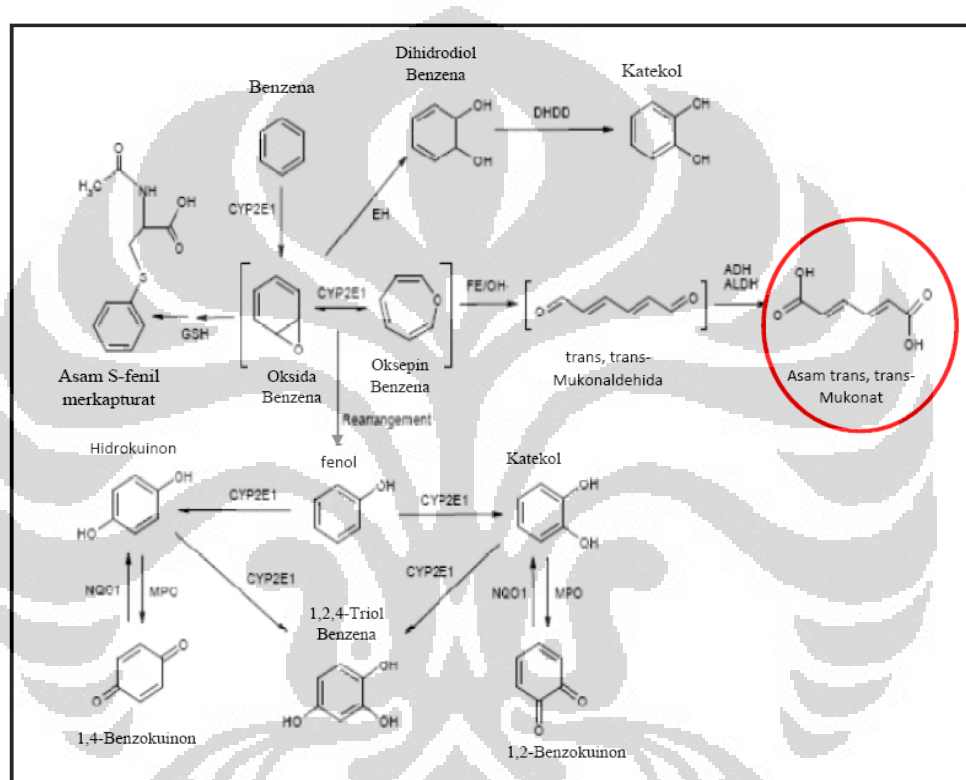
Berikut merupakan beberapa nilai standard benzena pada lingkungan kerja yang dikeluarkan oleh lembaga tersebut di atas¹⁷.

- OSHA : batas paparan yang diperbolehkan (*Permissible Exposure Limit/PEL*) adalah 1 ppm
- NIOSH : batas paparan yang dianjurkan (*Recommended Exposure limit/REL*) adalah 0,1 ppm
- ACGIH : nilai batas ambang rata-rata untuk waktu tertentu (*Threshold Limit Value-Time Weighted Average/TLV-TWA*) adalah 10 ppm

2.1.3 Metabolisme Benzena

Metabolisme benzena sebenarnya terjadi di hampir seluruh jaringan, namun tempat penyimpanan metabolit benzena yang utama ialah pada hati. Metabolit yang dihasilkan di hati selanjutnya dibawa ke sumsum tulang. Dari diagram di bawah dapat dilihat jalur metabolisme benzena. Tiap metabolit fenolik dari benzena (katekol, hidrokuinon, 1,2,4-benzenetriol, dan fenol) dapat mengalami konjugasi sulfonat ataupun glukuronat. Hasil konjugat dari fenol dan hidrokuinon merupakan metabolit yang paling banyak ditemukan di urin¹⁹⁻²².

Asam trans,trans-mukonat, fenol, katekol, hidrokuinon, dan benzokuinon dapat merangsang enzim sitokrom p-450 pada sistem sel darah manusia. Enzim ini mengkatalisis reaksi metabolisme benzena pada sumsum tulang, karena itu benzena dapat menyebabkan efek toksisitas pada sel darah (*hematotoxicity*). Benzena dapat menembus plasenta, sehingga bila ibu hamil terpapar benzena maka janinnya dapat juga terkena benzena ataupun senyawa metabolitnya²³⁻²⁵.



Gambar 2.1 Metabolisme benzena²⁶

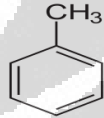
Asam trans, trans-mukonat (tt-MA) adalah metabolit kecil dari benzena yang dieskresikan dalam urin. Pengujian tt-MA dalam urin telah direkomendasikan sebagai biomarker untuk paparan benzena^{27,28}. Fenol, hidrokuinon, tt-MA, dan asam S-fenil merkapturat merupakan hasil metabolisme benzena di dalam urin yang dapat dijadikan indeks dari paparan benzena di lingkungan hidup. Namun dari semua senyawa metabolit tersebut tt-MA memiliki konsentrasi tertinggi. Hal ini yang membuat pengukuran tt-MA sebagai biomarker metabolit benzena di urin relatif aman.

2.2 Toluena

2.2.1 Sifat Fisik dan Kimia

Toluena merupakan senyawa organik siklis aromatik, cairan jernih, tak berwarna dengan bau yang dapat dibedakan. Toluena tidak mengakibatkan karat, mudah terbakar, dan tidak larut dalam air, tapi mudah bercampur dengan pelarut organik lainnya²⁹.

Tabel 2.2 Sifat fisik dan kimia toluena

No.	Sifat Fisik dan Kimia	Keterangan
1.	Rumus molekul	$C_6H_5CH_3$
2.	Rumus bangun	
3.	Nama lain	Metilbenzena, fenilmetana, metilbenzol, toluol
4.	Berat molekul	92,13 g/mol
5.	Densitas	0,867 g/ml pada 20 °C
6.	Titik didih	110,6 °C
7.	Titik Leleh	-95 °C
8.	Titik Nyala	4 °C
9.	Tekanan Uap pada 25 °C	3,8 kPa setara dengan 28,7 mm Hg
10.	Tegangan Permukaan (20 °C)	28,53 dynes/cm
11.	Indeks Refraksi (20 °C)	1,4969
12.	Log Koefisien Partisi (Oktanol/air	2,69
13.	Stabilitas	Stabil, harus dijauhkan dari zat pengoksidasi. Mudah menyala dan dapat meledak

[Sumber : US NIOSH (1973)³⁰]

2.2.2 Pemantauan di Lingkungan Kerja

Sumber paparan toluena secara umum berasal dari emisi kendaraan bermotor dan pesawat, serta asap rokok. Ketiganya menyumbangkan 65% toluena ke lingkungan. Selain ketiga hal yang disebutkan sebelumnya, kegiatan yang

melibatkan toluena akan menyumbangkan 33% toluena ke udara lingkungan dan kegiatan produksi toluena akan menyumbangkan 2% toluena ke udara lingkungan³¹.

Paparan toluena di lingkungan kerja umumnya terjadi pada pekerja yang menggunakan toluena atau produk yang mengandung toluena. Pekerja yang termasuk memiliki resiko terbesar terpapar toluena ialah pekerja bengkel, pekerja di industri lem, pekerja cat termasuk di dalamnya kegiatan pengenceran cat (*thinner*), penggunaan zat pembersih pelapis, dan pekerja di stasiun pengisian bahan bakar³².

Lembaga IARC telah mengklasifikasikan karsinogenitas toluena berada di grup ketiga, sehingga belum dapat dikategorikan sebagai penyebab kanker pada manusia. Akan tetapi, paparan yang terus-menerus dan melebihi nilai ambang batas dapat meningkatkan risiko efek terhadap kesehatan. Lembaga-lembaga seperti *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)*, *Occupational Safety and Health Administration (OSHA)*, *Environmental Protection Agency (US EPA)*, *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)*, dan *World Health Organization (WHO)* merekomendasikan bahwa nilai ambang batas (NAB) paparan untuk toluena di udara menurut waktu kerja 8 jam sehari (Threshold Limit Value – Time Weight Average), tidak boleh melebihi 100 ppm. Namun pada lembaga federal Jepang (*Japan of Occupational Safety and Health*) dan Indonesia, merekomendasikan konsentrasi toluena di udara tidak boleh melebihi 50 ppm. Untuk air minum, EPA merekomendasikan konsentrasi toluena tidak boleh melebihi 20 ppm dalam satu hari, 30 ppm untuk 10 hari, atau 1 ppm untuk konsumsi seumur hidup³².

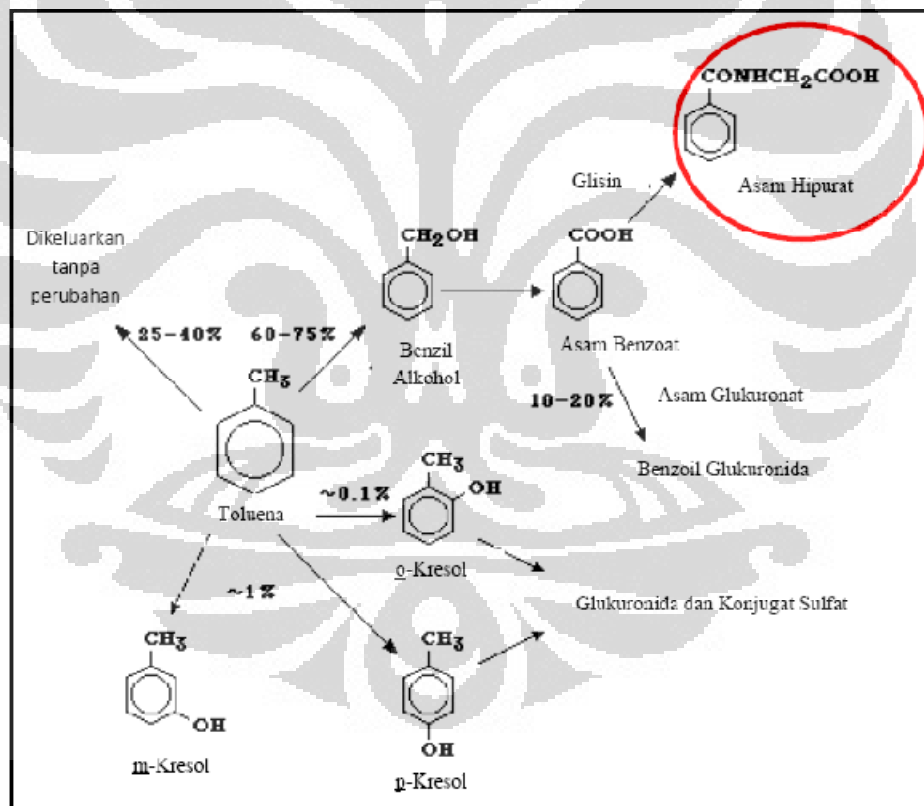
2.2.3 Metabolisme Toluena

Sifat toksik dari toluena dapat dijelaskan dari metabolisemenya. Toluena memiliki kelarutan rendah di dalam air, sehingga sukar dikeluarkan dari tubuh melalui jalur ekskresi utama (urin, kotoran, atau keringat). Oleh karenanya, toluena harus termetabolisme agar dapat dikeluarkan dari dalam tubuh³³.

Gugus metil pada toluena lebih mudah dioksidasi oleh sitokrom P-450 daripada cincin benzena. Hal ini menyebabkan pada metabolisme toluena, 95%

toluena yang diabsorpsi akan dioksidasi menjadi alkohol. Metabolit toksik yang disebabkan oleh sisa 5% metabolit akan teroksidasi menjadi benzaldehida dan kresol. Sebagian besar produk reaktif yang terbentuk akan mengalami detoksifikasi oleh konjugasi glutation. Akan tetapi, metabolit-metabolit yang terbentuk memiliki kemungkinan merusak sel dengan cara terikat pada epoksidanya³¹.

Sekitar 60% - 75% dari benzil alkohol dioksidasi di hati menjadi asam benzoat, yang selanjutnya akan terkonjugasi dengan glisin membentuk asam hippurat atau akan terkonjugasi dengan asam glukuronat membentuk benzil glukuronida. Beberapa metabolit toluena akan mengalami oksidasi oleh cincin aromatik membentuk orto- dan para-kresol³¹.



Gambar 2.2 Metabolisme toluena³⁴

Toluena dapat diekskresikan dari tubuh tanpa mengalami perubahan melalui udara pernapasan yang dihembuskan, atau dapat diekskresikan dalam

bentuk asalnya atau metabolitnya dalam urin. Sebagian besar dari toluena yang diinhalasi atau diingesti akan diekskresikan di urin sebagai metabolitnya (12 jam setelah paparan), sejumlah kecil (hingga 20 %) dikeluarkan sebagai toluena di udara ekshalasi. Kurang dari 2 % dari total metabolit toluena diekskresikan di empedu. Ekskresi toluena yang paling dominan adalah asam benzilmerkapturat dan asam hippurat, keduanya dibentuk oleh senyawa benzil alkohol pada oksidasi metabolit lebih lanjut³¹.

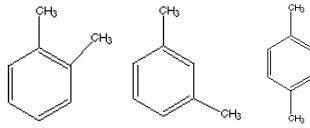
Asam hippurat merupakan metabolit utama dari paparan toluena. Paparan toluena dalam pelarut organik dapat dimonitor dengan mengikuti pola ekskresi metabolit di dalam urin³⁵. Orang tidak terpapar toluen akan mengekskresikan konsentrasi rata-rata <1,0 g asam hippurat / liter, sedangkan pekerja yang terpapar toluena akan mengekskresikan asam hippurat dengan konsentrasi setidaknya 2 - 6 kali lebih tinggi, tergantung pada tingkat paparan³¹.

2.3 Xilena

2.3.1 Sifat Fisik dan Kimia

Xilena memiliki tiga isomer yaitu orto-, meta, dan para-xilena. Ketiga isomer ini dapat ditemukan secara tunggal atau dalam susunan yang kompleks yang digabungkan dengan komponen lain. Dalam bidang komersil xilena yang umum dikenal adalah m-xilena yang berbentuk cairan, tidak berwarna, serta memiliki bau yang khas. Xilena juga memiliki isomer struktural yaitu etilbenzena dengan rumus struktur $(C_6H_5)(C_2H_5)$. Namun isomer ini tidak bersifat toksik pada tingkat paparan yang tinggi. Xilena mudah terbakar pada suhu kamar. Xilena tidak larut dalam air, tetapi mudah larut dalam pelarut organik. Xilena memiliki densitas yang lebih rendah dibandingkan dengan air, sehingga xilena akan mengapung di atas air.

Tabel 2.3 Sifat fisik dan kimia xilena

No.	Sifat Fisik dan Kimia	Keterangan
1.	Rumus molekul	$C_6H_4(CH_3)_2$
2.	Rumus bangun*	
2.	Keadaan pada suhu ruang	Jernih, larutan tak berwarna, mempunyai bau khas aromatik
3.	Masa molekul relative	106.16 gr/mol
4.	Titik didih pada 760 mm Hg *	144 ⁰ C, 139 ⁰ C, dan 138 ⁰ C
5.	Titik leleh *	25 ⁰ C, -47 ⁰ C, 13.4 ⁰ C
6.	Titik Nyala*	34.4 ⁰ C, 30.6 ⁰ C, 30.0 ⁰ C
7.	Densitas*	0.876, 0.860, dan 0.857
8.	Tekanan Uap *	0.91 kPa, 1.12 kPa, 1.118 kPa
9.	Range mudah terbakar	1.0% sampai 7.0% (konsentrasi di dalam air)

[Sumber : IPCS Inchem³⁶]

* masing-masing untuk orto-, meta, dan para-xilena

2.3.2 Pemantauan di Lingkungan Kerja

Xilena termasuk dalam bahan kimia yang paling banyak diproduksi di dunia. Xilena diperoleh dari minyak mentah dan digunakan secara luas dalam banyak produk seperti pembuatan parfum, formulasi pestisida, farmasi, pada proses percetakan, karet, plastik, dan kulit³⁷. Jalur paparan yang umum untuk senyawa xilena yakni dengan inhalasi, sehingga xilena mudah diserap dari paru-paru. Iritasi mata terjadi pada sekitar 200 ppm. Uap xilena lebih berat daripada udara sehingga dapat menyebabkan sesak napas dalam ruang yang tertutup, ventilasi yang buruk, atau daerah dataran rendah³⁸.

Berikut merupakan beberapa nilai standard xilena pada lingkungan kerja yang dikeluarkan oleh lembaga tersebut di atas.

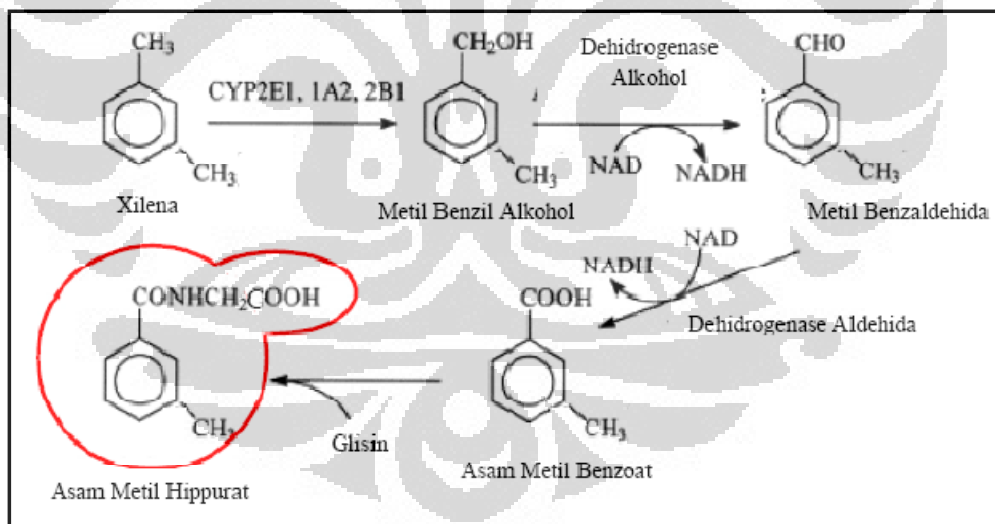
OSHA : batas paparan yang diperbolehkan (*Permissible Exposure Limit/PEL*) adalah 100 ppm untuk rata-rata selama 8 jam kerja

NIOSH : batas paparan yang dianjurkan (*Recommended Exposure Limits/RELS*) adalah 100 ppm untuk rata-rata selama 10 jam untuk setiap jam kerja dan 200 ppm selama 10 menit untuk 40 jam per minggu³⁹.

ACGIH : nilai batas ambang untuk xilena adalah 100 ppm untuk 8 jam per hari kerja, dan batas paparan xilena dalam jangka pendek adalah 150 ppm selama 15 menit untuk 40 jam per minggu⁴⁰.

2.3.3 Metabolisme Xilena

Metabolisme xilena dalam tubuh manusia terjadi melalui proses oksidasi yang menghasilkan asam metil benzoat^{41,42,43}. Asam metil benzoat akan terkonjugasi dengan glisin kemudian diekskresikan dalam urin sebagai asam metil hippurat. Konjugat glisin bersifat jenuh pada tubuh manusia bila paparannya sekitar 1174 mg/m³ (270 ppm) untuk paparan xilena saat bekerja dan untuk sekitar 3393 mg/m³ (780 ppm) pada saat istirahat⁴⁴.



Gambar 2.3 Metabolisme xilena⁴⁵⁻⁴⁸

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya⁴⁹.

Validasi metode analisis bertujuan untuk mengevaluasi kinerja metode, menguji faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kinerja metode dan mengetahui pengaruhnya terhadap hasil analisis, dan melakukan verifikasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diantaranya adalah

1. linearitas dan rentang
2. kecermatan (*accuracy*)
3. keseksamaan (*precision*)
4. selektivitas
5. batas deteksi (*Limit Of Detection*) dan batas kuantisasi (*Limit of Quantification*)
6. ketangguhan metode
7. kekuatan (*Robustness*)

2.4.1 Linearitas dan Rentang

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x)⁵⁰.

Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya⁵⁰.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit⁵¹.

2.4.2 Kecermatan

Kecermatan atau *accuracy* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya⁵¹. *Accuracy*

dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. *Accuracy* dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi dan metode adisi melalui penambahan baku (*standard addition method*), namun yang paling sering dilakukan adalah metode penambahan baku karena relatif lebih mudah dilakukan⁵¹.

Pada metode adisi (penambahan baku), sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit atau standar yang akan diperiksa ditambahkan ke dalam sampel untuk dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar analit/standar yang sebenarnya. Ketika penentuan batasan uji perolehan kembali (%R) melalui bagan kendali (*control chart*) belum ditentukan oleh laboratorium yang melakukan pengujian maka sebagai batasan awal (*starting point*) dapat dilakukan berdasarkan tabel dibawah ini:

Tabel 2.4 Batasan perolehan kembali (*recovery*)

Perbandingan konsentrasi <i>spiked sample</i> dengan <i>unspiked sampel</i>	Batasan %R pada tingkat kepercayaan 95%
100	80% - 120%
10	78% - 122%
5	76% - 124%
1	55% - 145%
0,5	28% - 170%
0,1	-200% - 400%
0,05	-480% - 680%

[Sumber : Swartz, M.E, dkk⁵²]

Berikut ini merupakan persamaan untuk mencari persen *recovery*

$$\boxed{\text{—————}} \quad (2.1)$$

Dimana, nilai terukur = konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan analit

Nilai target = konsentrasi sampel sebelum penambahan sejumlah analit ditambah dengan konsentrasi analit yang ditambahkan

2.4.3 Keseksamaan (*Precision*)

Keseksamaan atau *precision* merupakan ukuran kedekatan antar serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama. Konsep presisi diukur dengan simpangan baku. Presisi dapat dibagi lagi menjadi 2 atau 3 kategori. Komisi Eropa membagi presisi ke dalam keterulangan (*repeatability*) dan ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan merupakan presisi pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, dan dilakukan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan sering dirujuk sebagai pengukur. Ketertiruan menggambarkan presisi yang dilakukan pada percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya⁵².

Standar deviasi ketertiruan (*reproducibility*) pada umumnya 2-3 kali lebih besar dibanding standar deviasi keterulangan (*repeatability*). Kriteria seksama menurut Horwitz Trumpet diberikan jika metode memberikan persen simpangan baku relatif (% RSD) kurang dari atau sama dengan 16 % untuk daerah *trace* (dengan range 1 ppm – 1 ppb)⁵². Presisi akan menurun dengan menurunnya konsentrasi. Ketergantungan ini dirumuskan dengan:

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{c}} \times 100\% \quad (2.2)$$

dimana, RSD = standar deviasi relatif

SD = standar deviasi

\bar{c} = konsentrasi analit

2.4.4 Selektivitas

Selektivitas suatu metode analisis adalah kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti adanya pengotor, prekursor sintetik, produk degradasi, dan komponen matriks. Dalam teknik pemisahan, daya pisah (*resolusi*) antara analit yang dituju dengan pengotor lainnya harus >1,5. ICH membagi spesifisitas dalam 2 kategori, yakni uji

identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, selektivitas ditunjukkan dengan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekul yang hampir sama. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar, selektivitas ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang berdekatan (sebagaimana dalam kromatografi). Senyawa-senyawa tersebut biasanya adalah komponen utama atau komponen aktif dan atau suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat suatu pengotor maka metode uji harus tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini⁵².

Penentuan selektivitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Yang pertama (yang paling diharapkan), adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa yang dituju ≥ 2). Cara kedua untuk memperoleh selektivitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama⁵².

2.4.5 Batas Deteksi (*Limit Of Detection*) dan Batas Kuantisasi (*Limit Of Quantification*)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu⁵².

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan)⁵²

Cara menentukan limit deteksi dan limit kuantisasi adalah sebagai berikut⁵² :

$$\text{Limit Deteksi (LOD)} = \frac{\times}{\quad} \quad (2.3)$$

$$\text{Limit Kuantisasi (LOQ)} = \frac{\times}{\quad} \quad (2.4)$$

dimana SB : simangan baku

$$SB = \frac{\overline{\Sigma(\quad)}}{\quad} \quad (2.5)$$

2. 4. 6 Ketangguhan Metode (*Ruggedness*)

Ketangguhan metode (*ruggedness*) merupakan tingkat reproduibilitas hasil yang diperoleh di bawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai persen standar deviasi relatif (% RSD). Kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda. Ketangguhan suatu metode mungkin tidak akan diketahui jika suatu metode dikembangkan pertama kali, akan tetapi ketangguhan suatu metode akan terlihat jika digunakan berulang kali. Suatu pengembangan metode yang bagus mensyaratkan suatu evaluasi yang sistematis terhadap faktor-faktor penting yang mempengaruhi ketangguhan suatu metode⁵².

Strategi untuk menentukan ketangguhan suatu metode akan bervariasi tergantung pada kompleksitas metode dan waktu yang tersedia untuk melakukan validasi. Penentuan ketangguhan metode dapat dibatasi oleh kondisi-kondisi percobaan yang kritis, misalkan pengecekan pengaruh kolom kromatografi yang berbeda (pabrik dan jenisnya sama) atau pengaruh-pengaruh operasionalisasi metode pada laboratorium yang berbeda. Dalam kasus seperti ini, semua faktor harus dijaga konstan seperti fase gerak dan reagen-reagen yang digunakan⁵².

2. 4.7 Kekuatan (*Robustness*)

Kekuatan merupakan kapasitas metode analisis untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Kekuatan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti: persentase pelarut organik, pH, kekuatan ionik, suhu, dan sebagainya. Suatu praktek yang baik untuk mengevaluasi kekuatan suatu metode adalah dengan memvariasi parameter-parameter penting dalam suatu metode secara sistematis lalu mengukur pengaruhnya pada pemisahan⁵².

2. 5 *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Sejak tahun 1970-an, instrumen *Gas Chromatography–Mass Spectrometry* (GC-MS) telah populer dalam penelitian di bidang ilmu pengetahuan kimia dan bidang terkait lainnya. Namun, pengetahuan akan teknik ionisasi yang lebih spesifik seperti ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization / API*) dan metode analisis ion lainnya yang lebih unggul membuat sebagian besar ilmuwan sepakat untuk menggunakan spektrometri massa yang lebih spesifik⁵³.

Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian bio-analisis dimulai pada akhir 1980-an^{54,55}. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS meliputi⁵³

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spektrometer masa “klasik”, penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
4. Kaya Informasi. Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter

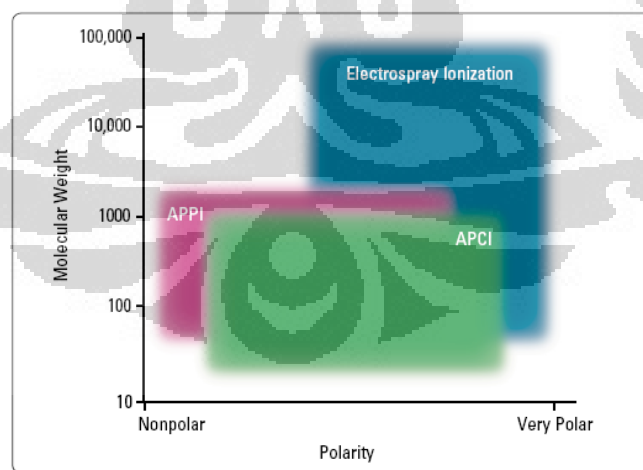
Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi mereka (m/z). Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan⁵⁶.

2.5.1 Sumber Ion (*Ion Source*)

Selama sepuluh tahun terakhir banyak kemajuan pada LC-MS/MS dalam pengembangan sumber ion dan teknik untuk mengionisasi dan memisahkan ion molekul analit dari fase geraknya. Sebelumnya LC-MS/MS menggunakan sistem antarmuka yang kurang baik dalam memisahkan molekul fase gerak dari molekul analit. Molekul-molekul analit yang terionisasi dalam spektrometer massa berada pada kondisi vakum, peristiwa semacam ini sering terjadi pada ionisasi elektron tradisional. Teknik ini berhasil hanya untuk jumlah senyawa yang sangat terbatas⁵⁶.

Pengenalan teknik ionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure ionization* / API) sangat memperluas jumlah senyawa yang dapat dianalisis dengan LC-MS/MS. Pada teknik ionisasi tekanan atmosfer, molekul analit terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer. Ion-ion analit tersebut kemudian secara mekanis dan elektrostatis terpisah dari inti molekul. Teknik ionisasi tekanan atmosfer umumnya adalah⁵⁶:

1. ionisasi elektropray (*electrospray ionization* / ESI)
2. ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI)
3. photoionisasi tekanan atmosfer (APPI)



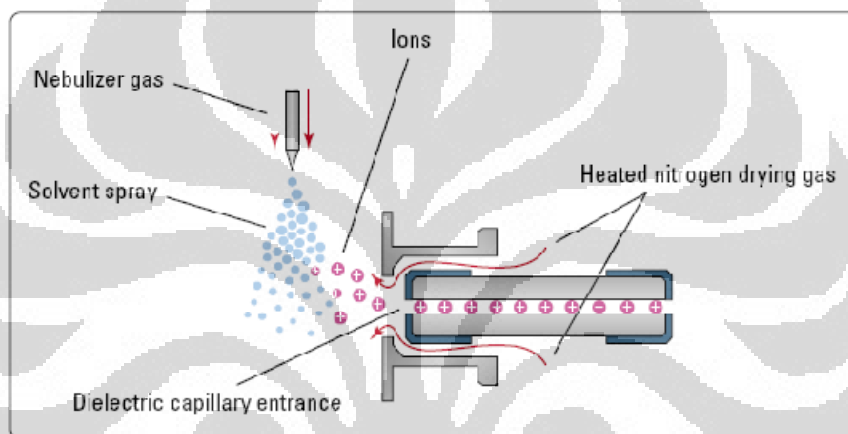
Gambar 2.4 Aplikasi dari berbagai teknik ionisasi LC-MS/MS⁵⁶

Dalam setiap pengukuran, sifat analit dan kondisi pemisahan memiliki pengaruh kuat untuk memberikan hasil terbaik dalam teknik ionisasi pada

elektrospray, APCI, maupun APPI. Teknik yang paling efektif tidak selalu mudah untuk diprediksi⁵⁶.

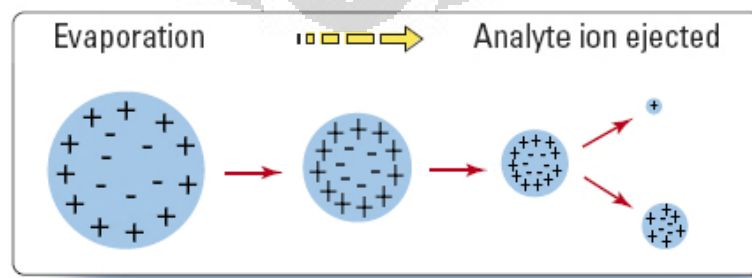
2.5.1.1 Ionisasi Elektrospray (*electrospray ionization* / ESI)

Ionisasi elektrospray bergantung pada pelarut yang digunakan untuk memungkinkan analit mampu mengion dengan baik sebelum mencapai spektrometer massa. Eluen LC disemprotkan bersamaan dengan gas nebulizer ke dalam bidang elektrostatis pada tekanan atmosfer yang akan menyebabkan disosiasi lebih lanjut molekul analit⁵⁶.



Gambar 2.5 Sumber Ion Elektrospray⁵⁶

Pada saat yang bersamaan gas yang dipanaskan menyebabkan menguapnya pelarut sehingga tetesan analit menyusut, konsentrasi muatan dalam tetesan meningkat. Keadaan akan memaksa ion untuk bermuatan melebihi kekuatan kohesif atau ion dikeluarkan ke dalam fasa gas. Ion-ion yang tertarik akan melewati pipa kapiler pengambilan sampel yang selanjutnya akan di teruskan ke dalam analisis massa⁵⁶.

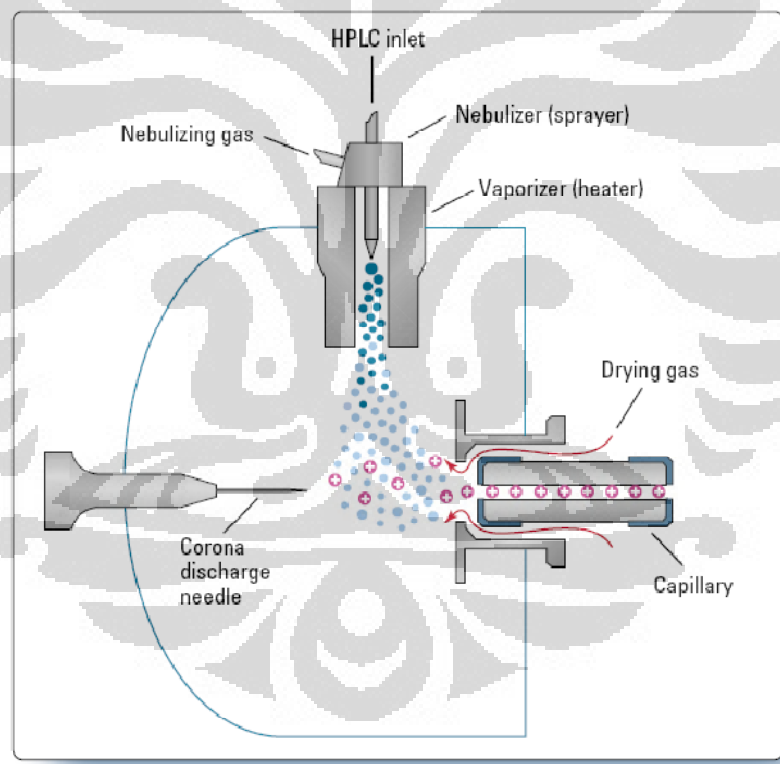


Gambar 2.6 Desorpsi ion dari larutan⁵⁶

Elektrospray sangat berguna untuk menganalisis molekul besar seperti protein, peptida, dan oligonukleotida. Namun dapat juga menganalisis molekul kecil seperti benzodiazepin⁵⁶.

2.5.1.2 Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (*atmospheric pressure chemical ionization / APCI*)

Dalam APCI, eluen LC disemprotkan melalui sebuah pemanas (umumnya bersuhu 250 °C - 400 °C), proses berlangsung pada tekanan atmosfer. Udara panas akan menguapkan cairan. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionisasi oleh elektron dari jarum korona. Ion-ion pelarut kemudian mentransfer muatan pada molekul analit melalui reaksi kimia (ionisasi kimia). Ion-ion analit melewati pipa kapiler pengambilan sampel yang dilanjutkan ke dalam analisis massa⁵⁶.



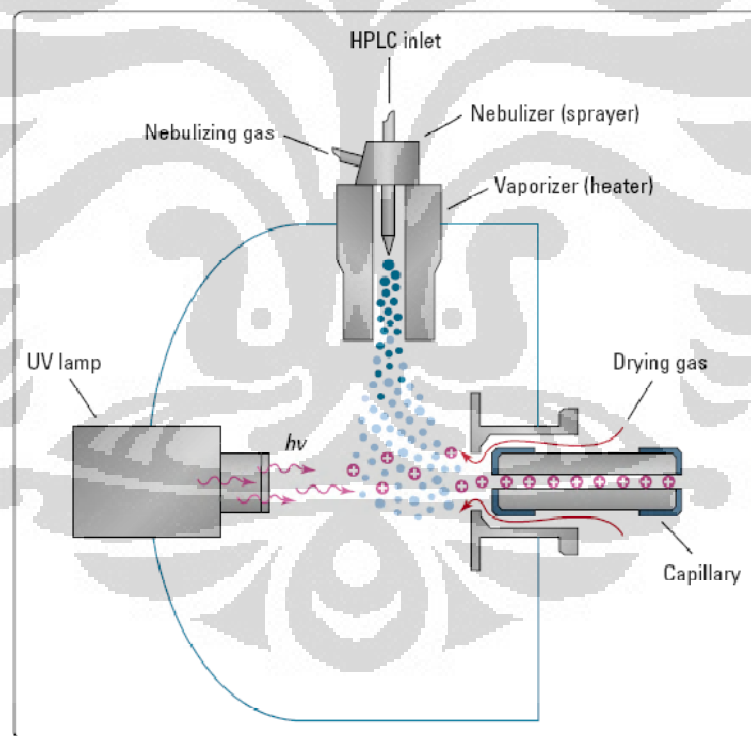
Gambar 2.7 Sumber ion APCI⁵⁶

APCI berlaku untuk berbagai kutub dan molekul nonpolar. Karena melibatkan suhu tinggi, APCI kurang cocok dibandingkan dengan elektrospray untuk analisis biomolekul besar yang mungkin secara termal tidak stabil. APCI

lebih sering digunakan pada kromatografi fase normal dibandingkan dengan sumber ion elektrospray karena analit yang biasanya nonpolar⁵⁶.

2.5.1.3 Photoionisasi Tekanan Atmosfer (*atmospheric pressure photoionization / APPI*)

Photoionisasi tekanan atmosfer (*atmospheric pressure photoionization / APPI*) untuk LC / MS merupakan teknik yang relatif baru. Penguap mengubah eluen LC menjadi fasa gas. Sebuah lampu bermuatan menghasilkan foton dalam kisaran energi ionisasi yang kecil. Kisaran energi dipilih ialah energi yang mampu mengionisasi molekul analit sebanyak dan mampu mungkin meminimalkan ionisasi molekul pelarut. Ion-ion yang dihasilkan akan melewati pipa kapiler pengambilan sampel ke dalam analisis massa⁵⁶.



Gambar 2.8 Sumber ion APPI⁵⁶

Hampir semua senyawa yang biasa dianalisis oleh APCI dapat dianalisis pula dengan APPI. Hal ini menunjukkan kemiripan di dalam dua aplikasi, yakni

menganalisis senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir yang rendah (<100 ml/ menit), dimana kesensitivitasan APCI terkadang berkurang⁵⁶.

2.5.2 Analisis Masa (*mass analyzers*)

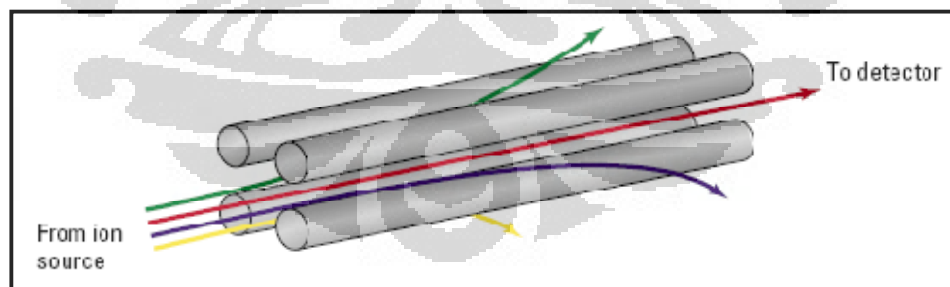
Meskipun dalam teori semua jenis analisis massa dapat digunakan untuk LC-MS/MS, namun kenyataannya ada empat jenis analisis massa yang paling sering digunakan:

1. quadropole
2. *time-of-flight*
3. perangkap ion
4. *fourier transform-ion cyclotron resonance* (FT-ICR)

Masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan tergantung pada persyaratan dari analisis yang akan digunakan⁵⁶.

2.5.2.1 Quadropole

Sebuah analisis massa quadropole terdiri dari empat batang paralel diatur dalam persegi. Ion analit diarahkan ke bagian tengah persegi. Tegangan yang dialirkan pada batang menghasilkan bidang elektromagnetik. Bidang ini menentukan rasio masa yang dapat melewati filter pada waktu tertentu. Quadropoles cenderung merupakan analisis massa yang paling sederhana dan paling murah.

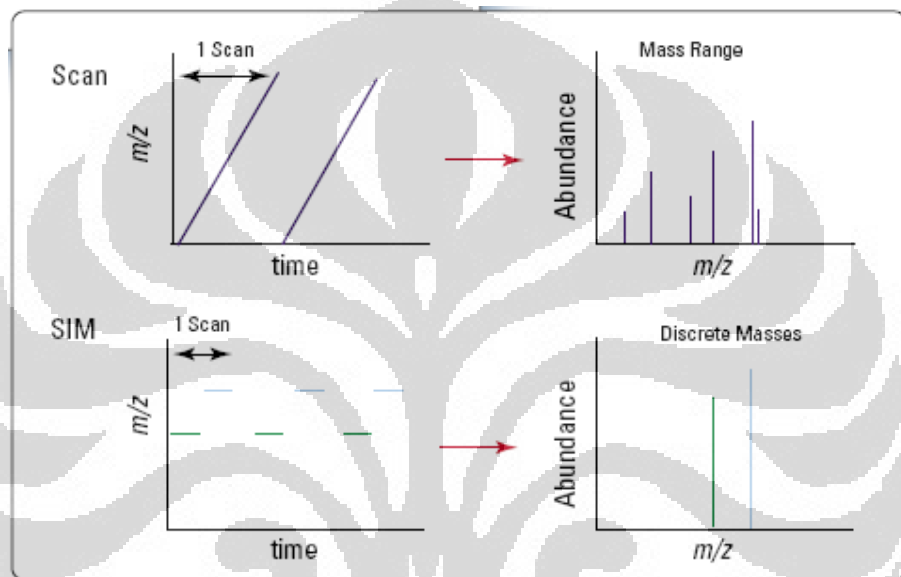


Gambar 2.9 Analisis massa quadropoles⁵⁶

Analisis massa quadropole dapat beroperasi dengan dua mode:

- Memindai (*scan*) modus
- Pemantauan ion terpilih (*selected ion monitoring* / SIM) modus

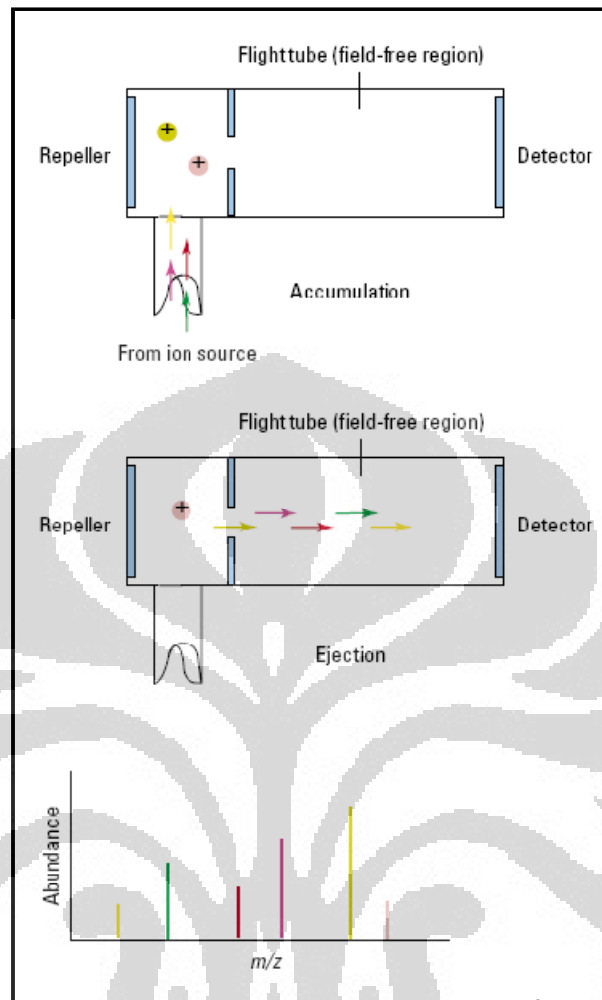
Dalam mode scan, analisis massa memantau berbagai rasio m/z . Dalam modus SIM, analisa masa hanya memantau beberapa rasio m/z . Modus SIM jauh lebih sensitif dibandingkan modus memindai tetapi memberikan informasi tentang fragmentasi ion yang lebih sedikit. Modus pindai biasanya digunakan untuk analisis kualitatif atau untuk kuantisasi ketika semua massa analit tidak diketahui sebelumnya. Modus SIM digunakan untuk kuantisasi dan pemantauan senyawa target⁵⁶.



Gambar 2.10 Modus pindai dan SIM

2.5.2.2 Time-of-Flight (TOF)

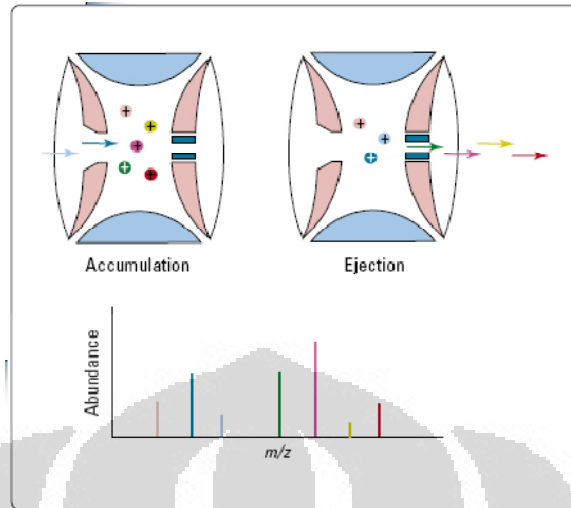
Pada analisis massa *time-of-flight* (TOF), sebuah gaya elektromagnetik yang seragam diterapkan untuk semua ion pada waktu yang sama. Hal ini menyebabkan ion akan dipercepat menyusuri tabung penerbangan. Ion yang lebih ringan berjalan lebih cepat dan tiba pada detektor paling awal, sehingga rasio fragmentasi ion m/z ditentukan oleh waktu kedatangan mereka. Analisis massa (TOF) memiliki kisaran massa yang luas dan sangat akurat pada pengukuran massa suatu senyawa⁵⁶.



Gambar 2.11 Analisis massa *time-of-flight* (TOF)⁵⁶

2.5.2.3 Perangkap Ion

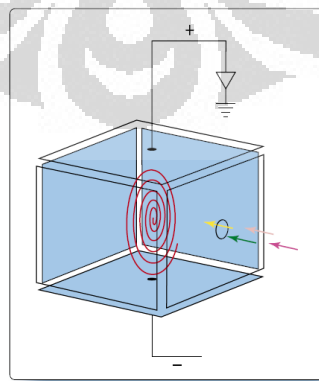
Analisis massa perangkap ion massa terdiri dari elektroda melingkar cincin dua penutup di kedua ujungnya yang bersama-sama membentuk sebuah ruang. Ion memasuki ruang dan terjebak oleh medan elektromagnetik. Bidang lain digunakan untuk mengeluarkan dengan selektif dari dalam perangkap. Perangkap ion memiliki kelebihan dapat melakukan beberapa tahapan pengukuran spektrometer massa tanpa analisis massa tambahan⁵⁶.



Gambar 2.12 Analisis massa perangkap ion⁵⁶

2.5.2.4 *Fourier transform-ion cyclotron resonance (FT-ICR)*

Analisis massa FT-ICR merupakan jenis lain dari analisis massa perangkap ion. Ion memasuki ruangan dan terjebak dalam lingkaran orbit oleh medan listrik dan medan magnet yang kuat. Ketika terjadi eksitasi oleh frekuensi radio (RF) pada medan listrik, ion menghasilkan arus yang bergantung pada waktu. Arus ini dikonversi oleh fourier menjadi frekuensi orbital dari ion yang sesuai dengan rasio muatan massa senyawa. Seperti perangkap ion, analisis massa FT-ICR dapat melakukan beberapa tahapan spektrometri massa tanpa analisis massa tambahan. FT-ICR juga memiliki rentang massa yang lebar dan resolusi massa yang sangat baik. FT-ICR merupakan analisis massa termahal diantara yang lain⁵⁶.



Gambar 2.13 Analisis massa FT-ICR⁵⁶

2.5.3 Penggabungan dengan Metode *Liquid Chromatography*

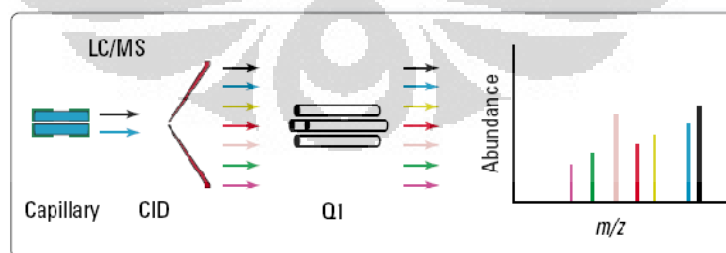
Teknik ionisasi tekanan atmosfer yang dibahas umumnya menghasilkan:

- ✓ Molekul ion M^+ atau M^-
- ✓ molekul terprotonasi $[M + H]^+$
- ✓ ionisasi molekul sederhana $[M + Na]^+$
- ✓ Ion yang mewakili kehilangan molekul sederhana seperti hilangnya air $[M + H - H_2O]^+$

Berat molekul yang dihasilkan memberikan informasi sangat berharga, tapi pelengkap informasi struktural sering dibutuhkan. Dalam memperoleh informasi struktural, ion analit terfragmentasi karena molekul bertabrakan dengan netral yang dikenal sebagai disosiasi tabrakan induksi (*collision induced disosiasi / CID*) atau disosiasi tabrakan diaktifkan (*collisionally activated dissociation / CAD*). Tegangan diberikan kepada ion-ion analit untuk menambah energi agar mampu melakukan tabrakan sehingga menciptakan fragmentasi lagi⁵⁶.

2.5.3.1 CID Pada Satu Tahap MS

CID yang paling sering dihubungkan dengan dua tahap spektrometer massa dimana terjadi pada setiap tahap penyaringan MS, tapi CID juga dapat dicapai dalam satu tahap spektrometer massa quadrupole atau TOF. Pada satu tahap spektrometer massa, CID terjadi dalam sumber ion dan dengan demikian kadang-kadang disebut sumber CID atau *di-source* CID. Analit (prekursor) ion yang dipercepat dan bertabrakan dengan molekul netral sisa untuk menghasilkan fragmen disebut ion produk⁵⁶.



Gambar 2.14 Analisis massa CID dengan satu quadrupole⁵⁶

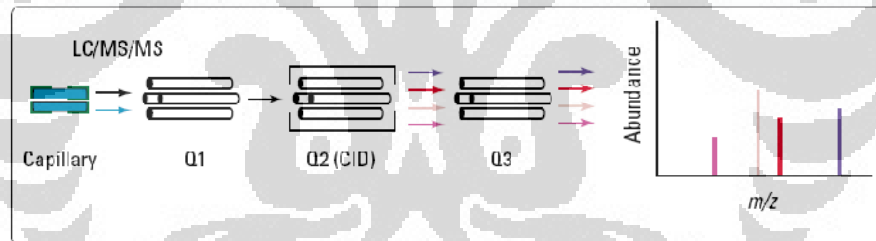
Keuntungan melakukan CID di satu tahap instrumen adalah kesederhanaan mereka dan biaya yang relatif rendah. Kelemahannya adalah semua ion akan

terfragmentasi. Dalam proses ini tidak ada kesempatan untuk memilih ion prekursor secara spesifik sehingga tidak ada cara yang pasti untuk menentukan ion produk yang berasal dari ion prekursor⁵⁶.

Spektrum yang dihasilkan mungkin termasuk puncak massa dari ion atau senyawa pengotor dan senyawa analit yang diinginkan. Proses ini mungkin dapat diterima ketika menganalisis sampel yang relatif murni, tetapi tidak memberikan hasil yang baik jika puncak kromatografi tidak memiliki intensitas yang baik⁵⁶.

2.5.3.2 CID Pada Dua Tahap MS

Beberapa tahap MS atau disebut juga *tandem* MS atau MS/MS adalah cara yang ampuh untuk mendapatkan informasi struktural. Dalam *triple* quadrupole, quadrupole pertama digunakan untuk memilih prekursor ion. CID mengambil tempat di tahap kedua dimana terjadi proses tabrakan. Pada tahap ketiga akan menghasilkan spektrum produk ion. Pada proses ini terjadi seleksi ion, dimana hanya ion produk yang memenuhi kuantitas dan kualitas senyawa target yang akan ditampilkan dalam spektrum⁵⁶.



Gambar 2.15 MS/MS dalam spektrometer massa triple-quadrupole⁵⁶

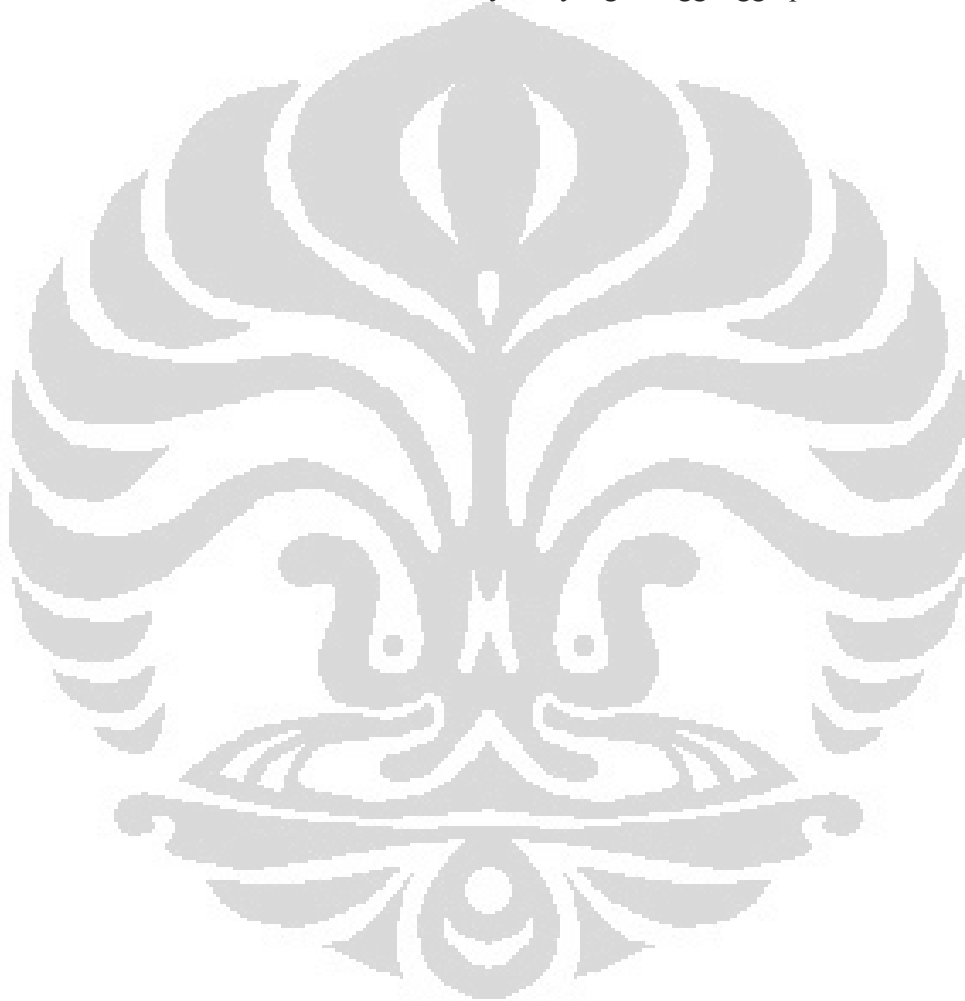
Pada awal kemunculan sistem LC-MS/MS banyak keterbatasan pada masalah dasar seperti jumlah eluen LC sehingga spektrometer massa dapat menerima dengan baik. Perubahan metode LC sangat diperlukan untuk menyesuaikan dengan detektor MS⁵⁶.

Sistem modern LC-MS/MS lebih fleksibel. Spektrometer massa dapat menerima kecepatan alir eluen hingga 2 ml/menit. Dengan sedikit modifikasi, instrumen yang sama juga dapat memberikan hasil yang baik pada aliran mikroliter dan nanoliter. Sumber ion dengan ortogonal (*off-axis*) nebulizer lebih

toleran dari nonvolatile buffer dan hanya memerlukan sedikit penyesuaian pada perbedaan komposisi pelarut dan kecepatan alir⁵⁶.

Perubahan metode LC modern yang diperlukan untuk sistem LC-MS/MS umumnya berupa persiapan sampel dan pelarut kimia yang berguna untuk:

- ✓ memastikan konsentrasi analit yang memadai
- ✓ memaksimalkan proses ionisasi melalui pemilihan pelarut dan buffer
- ✓ minimalkan keberadaan senyawa yang mengganggu proses ionisasi



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi

Proses isolasi BTX dalam urin dilakukan di laboratorium penelitian Departemen Kimia FMIPA UI, sedangkan untuk analisis deteksi BTX menggunakan LC-MS/MS di laboratorium instrumentasi Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain :

- ✓ Seperangkat instrumen LC-MS/MS lengkap (UFLC SHIMADZU CORP-MS/MS 3200 QTRAP ABSCIEX)
- ✓ Pompa vakum model DOA-P10B-DB (GAST. MFG-CORP Benton Harbor, Mich U.S.A)
- ✓ Ultrasonikator (Branson 2510)
- ✓ Syringe 1 mL (Hamilton 81320)
- ✓ Neraca analitik (mettler Toledo)
- ✓ Filter syringe Nylon 0.45 μm millipore millex-HN
- ✓ Pipet mikro 100-1000 μL dan 10-100 μL (Biohit)
- ✓ Cellulose nitrat membran filter (Whattman)
- ✓ Glass microfibre filter GF/F (Whattman)
- ✓ Vial LC auto-sampler 1 mL
- ✓ Peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan anatara lain :

- ✓ Standar asam, trans-trans mukonat dengan kemurnian 98%
- ✓ Standar asam hippurat dengan kemurnian $\geq 97\%$
- ✓ Standar asam 2-metil hippurat dengan kemurnian 98%
- ✓ Standar asam 3-metil hippurat dengan kemurnian 98%

- ✓ Standar asam 4-metil hippurat dengan kemurnian 98%
- ✓ Etil asetat p.a
- ✓ Asetonitril (Baker analyzed HPLC Ultra gradient solvent)
- ✓ Aquabides
- ✓ Asam asetat glasial p.a
- ✓ Natrium klorida
- ✓ HCl 6N
- ✓ Sampel urin

3.3 Kondisi LC-MS/MS

Kondisi LC-MS/MS pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- ✓ Detektor : Spektrometer massa 3200 Qtrap
- ✓ Kolom : Kolom Phenomenex C18 (50 mm x 2.0 mm)
- Fasa gerak : A : campuran aqua bidest + asam asetat glasial
B : asetronitril
- ✓ Aliran : elusi gradien 10%-30% eluen B
- ✓ Volume Injeksi : 10 μ L
- ✓ Temperatur kolom : 25 °C
- ✓ Laju aliran : 0.4 mL/min
- ✓ Waktu analisis : \pm 13 menit

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Preparasi Larutan Induk Baku

Semua serbuk standar dari analit asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat dilarutkan ke dalam aquabides hingga mencapai konsentrasi 1000 mg/L. Untuk serbuk standar dari analit asam trans, trans-mukonat dilarutkan ke dalam aquabides hingga mencapai konsentrasi 150 mg/L

3.4.2 Preparasi Fase Gerak

Preparasi fase gerak dilakukan dengan mencampurkan 0.125 mL asam asetat glasial ke dalam 500 mL aquabidest dan dikocok hingga homogen.

Campuran aquabidest dan asam asetat glasial selanjutnya disaring dengan pompa vakum dan dilakukan degassing selama kurang lebih 30 menit untuk menghilangkan gas-gas terlarut.

Asetonitril LC grade disaring dengan pompa vakum untuk menghilangkan gelembung dan pengotor yang lain yang dapat mempengaruhi kolom LC. Selanjutnya dilakukan degassing selama kurang lebih 30 menit untuk menghilangkan gas-gas terlarut.

3.4.3 Persiapan Instrumen LC-MS/MS

Kolom yang digunakan pada penelitian ini adalah Phenomenex C18 (50 mm x 2.0 mm), dan detektor spektrometer massa 3200 Qtrap. Pompa yang digunakan merupakan mode aliran tidak tetap atau elusi gradien untuk memperoleh komposisi fase gerak yang optimum selama analisis. Komposisi fase gerak diatur secara otomatis dengan gradien 10% - 30% larutan asetonitril dengan pengaturan waktu. Sementara suhu kolom diatur pada suhu ruang yaitu 25°C.

Pertama-tama instrumen LC dipersiapkan dengan melakukan *purging* terhadap kolom LC guna menghilangkan sisa-sisa eluen yang masih terdapat pada kolom. Setelah *purging*, maka dilanjutkan dengan *pumping* terhadap eluen atau fasa gerak selama kurang lebih 5 menit dan dilakukan *equilibrate* selama 5 menit. Hal ini bertujuan untuk menstabilkan kolom sehingga sistem LC siap digunakan untuk analisis.

3.4.4 Optimasi Kondisi Spektrometer Massa

Kondisi spektrometer massa diatur sedemikian rupa dengan cara memvariasikan beberapa parameter guna mendapatkan kondisi optimum pada quadrupole 1 (Q1) dan quadrupole 3 (Q3) sehingga mampu memilih prekursor ion serta produk ion yang tepat untuk senyawa tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA. Adapun parameter-parameter tersebut antara lain adalah *declustering potential* (DP), *enterance potential* (EP), *collision energy* (CE), dan *collision cell exit potential* (CXP).

3.4.5 Optimasi Kondisi Sumber Ion (*Ion Source*)

Kondisi sumber ion (*ion source*) diatur sedemikian rupa dengan cara memvariasikan beberapa parameter guna mendapatkan kondisi optimum kelima senyawa mampu mengion dan mampu memisahkan ion molekul analit dari pelarutnya. Adapun parameter - parameter tersebut antara lain adalah *curtain gas* (CUR), *collision gas* (CAD), *ion spray votage* (IS), suhu (TEM), nebulizer gas 1 (GS1) dan nebulizer gas 2 (GS2).

3.4.6 Optimasi Kondisi Kromatografi

Kondisi kromatografi diatur sedemikian rupa dengan cara memvariasikan beberapa parameter guna mendapatkan kondisi optimum pemisahan kelima analit, ttMA, HA, 2MHA, 3MHA, dan 4MHA. Adapun parameter- parameter tersebut antara lain adalah komposisi serta laju alir fasa gerak yang digunakan.

Kondisi optimum kromatografi yang terpilih merupakan kondisi yang akan menghasilkan pemisahan kelima analit dengan baik pada waktu retensi yang relatif singkat.

3.4.7 Metode Validasi

3.4.7.1 Linearitas

Linearitas ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA dilakukan dengan membuat deret standar dari masing masing larutan standar berbagai konsentrasi. Masing-masing konsentrasi larutan standar ditentukan sebanyak 7 kali pengulangan sehingga diperoleh persamaan garis lurus dengan $R^2 > 0,996$.

3.4.7.2 Akurasi

Akurasi terhadap kelima analit dilakukan dengan menggunakan metode penambahan baku atau spiking. Campuran larutan standar ttMA, HA, 2MHA, 3MHA, 4MHA dengan konsentrasi 10 ppm ditambahkan kedalam sampel terpilih lalu dianalisa kembali kadarnya. Akurasi ditentukan dengan menghitung persen perolehan kembali (*% recovery*).

3.4.7.3 Presisi

Uji presisi dilakukan terhadap masing-masing larutan standar kelima analit. Nilai presisi akan diwakilkan oleh nilai simpangan deviasi (SD) dan persen simpangan deviasi relatif (%RSD) dari keterulangan atau repeatability masing-masing deret standar yang diukur pada suatu konsentrasi dengan multi replikasi (7 kali pengulangan).

3.4.7.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi

Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi dilakukan terhadap larutan standar dengan batasan konsentrasi yang lebih luas yaitu dari 0.05 ppm hingga 1 ppm. Dari deret standar yang diukur kemudian ditentukan konsentrasi terkecil dimana ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA masih dapat terdeteksi dengan baik oleh instrumen dan masih dapat memberikan respon seksama.

3.4.8 Pengujian Sampel

3.4.8.1 Analisis Kualitatif

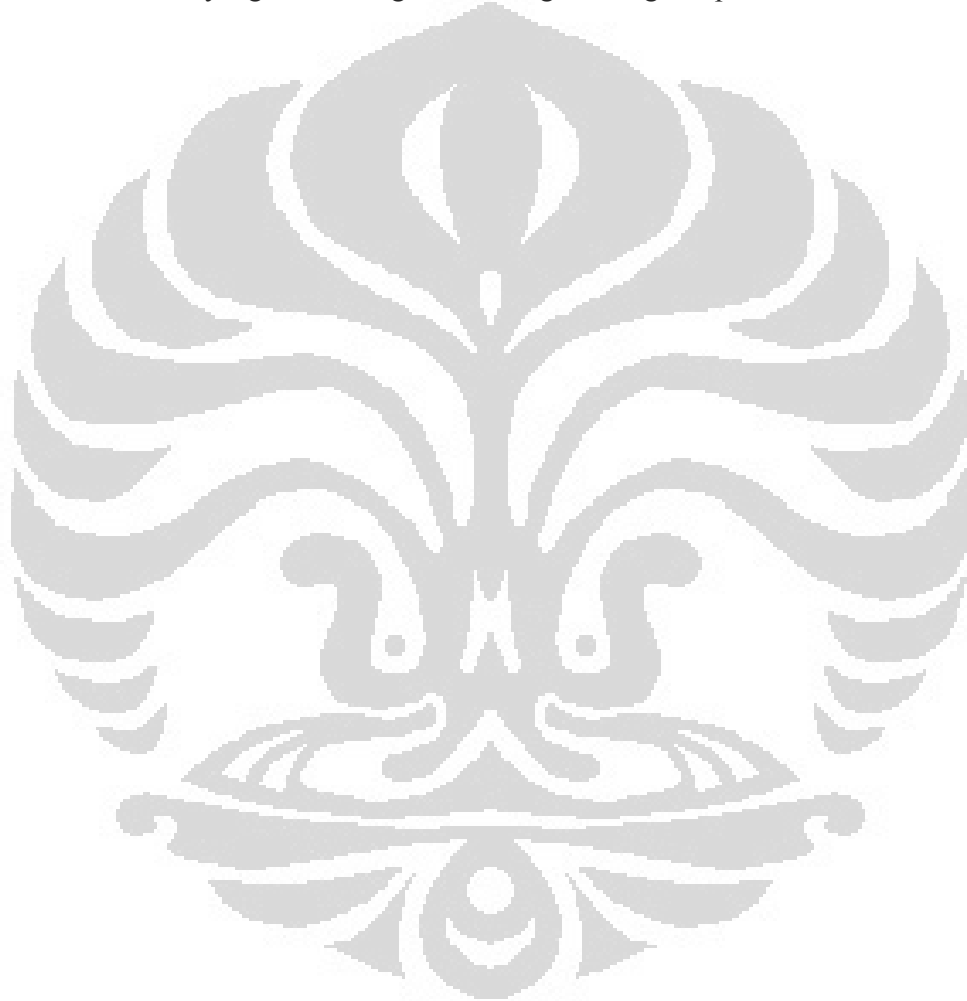
Analisis kualitatif terhadap sampel dilakukan dengan membandingkan hasil analisa fragmentasi / dari masing-masing sampel urin yang akan diuji dengan fragmentasi / larutan standar ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA.

3.4.8.2 Analisis Kuantitatif

Masing-masing sampel yang akan diuji kadarnya dipipet sebanyak 1 mL dan dilakukan ekstraksi sesuai prosedur NIOSH 8301⁵. Proses ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 80 μ L HCl 6 N kedalam 1 mL sampel urin. Diaduk selama 1 menit, kemudian ditambahkan 0,3 gram NaCl dan 4 mL etil asetat, selanjutnya dilakukan pengadukan selama 5 menit. Setelah terbentuk sistem 2 fasa, 200 μ L fasa organik (bagian atas) dimasukkan ke dalam vial LC. Kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Larutkan kembali

residu dengan aquabides lalu diaduk selama 5 menit agar residu terlarut sempurna.

Setelah itu masing-masing sampel diinjeksikan kedalam sistem LC dan diukur luas peak dari ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA kemudian dilakukan perhitungan dengan menggunakan persamaan garis dari kurva linearitas untuk menentukan kadar dari ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA yang terkandung dari masing- masing sampel.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

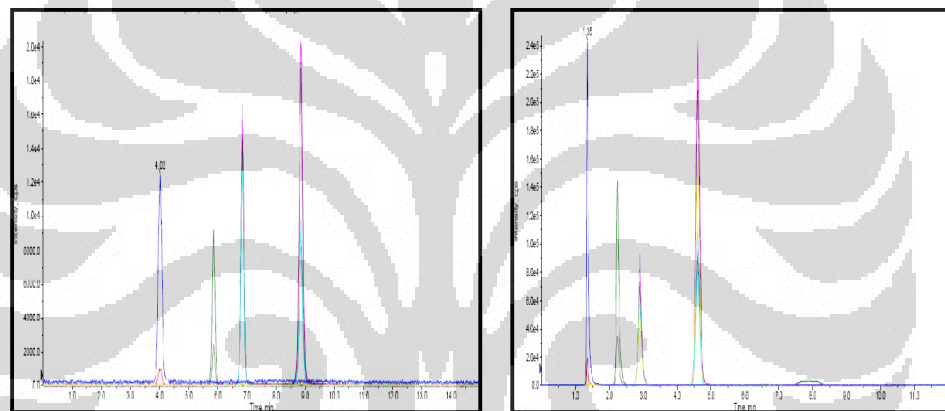
Pada penelitian ini telah dilakukan validasi metode LC-MS/MS dengan sebelumnya melakukan optimasi kondisi LC-MS/MS untuk penentuan senyawa asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat dalam urin sebagai biomarker paparan benzena, toluena, dan xilena (BTX). Kegiatan validasi metode LC-MS/MS untuk penentuan senyawa metabolit BTX dalam urin telah dilakukan sebelumnya oleh Laura Sabatini beserta keempat rekannya dengan pemilihan biomarker yang berbeda yakni asam fenil merkapturat, asam benzil merkapturat, dan asam o-metil benzil merkapturat. Di dalam jurnalnya disebutkan bahwa Laura Sabatini menggunakan fase gerak asam format dan metanol. Sedangkan pada penelitian ini digunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat glasial di dalam air, sesuai dengan prosedur NIOSH 8301⁵. Keuntungan menggunakan fase gerak asetonitril dan asam asetat glasial di dalam air dapat dilihat dari segi ekonomis, harga cukup terjangkau. Selain itu setelah dilakukan perbandingan dengan fase gerak asam format dan metanol, peak yang dihasilkan memiliki intensitas lebih rendah dari peak yang dihasilkan dengan penggunaan asetonitril dan campuran asam asetat glasial dalam air.

Keseluruhan penelitian ini mengikuti prosedur NIOSH 8301 dengan modifikasi instrumen yang digunakan serta modifikasi elusi pada fase gerak. NIOSH *Manual of Analytical Methods* menerapkan prosedur ini pada instrumen HPLC-UV dengan sistem isokratik pada aliran fase gerak. Sedangkan penelitian yang dilakukan menggunakan instrumen LC-MS/MS dengan sistem gradien pada aliran fase gerak.

4.1 Pemisahan tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA

Senyawa metabolit BTX, asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat (tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA) dapat terpisah dengan baik pada kolom C18 dengan bantuan fase gerak yang sesuai. Telah dilakukan percobaan dengan menggunakan

fase gerak metanol dan campuran asam format serta amoniun asetat dalam air. Kelima analit terpisah dengan baik dengan waktu di atas 6 menit dan intensitas peak mencapai 2×10^4 cps. Hal yang berbeda ditemukan pada fase gerak asetonitril dan campuran asam asetat glasial dalam air, kelima analit terpisah dengan baik dengan waktu dibawah 6 menit dan intensitas peak mencapai 2×10^5 cps. Perbandingan hasil dari dua tipe fase gerak yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 4.1. Senyawa asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat akan terpisah dengan baik pada kolom C18 dengan fase gerak asetonitril dan campuran asam asetat glasial dalam air yang dibuktikan dengan waktu yang relatif singkat dan intensitas yang tinggi

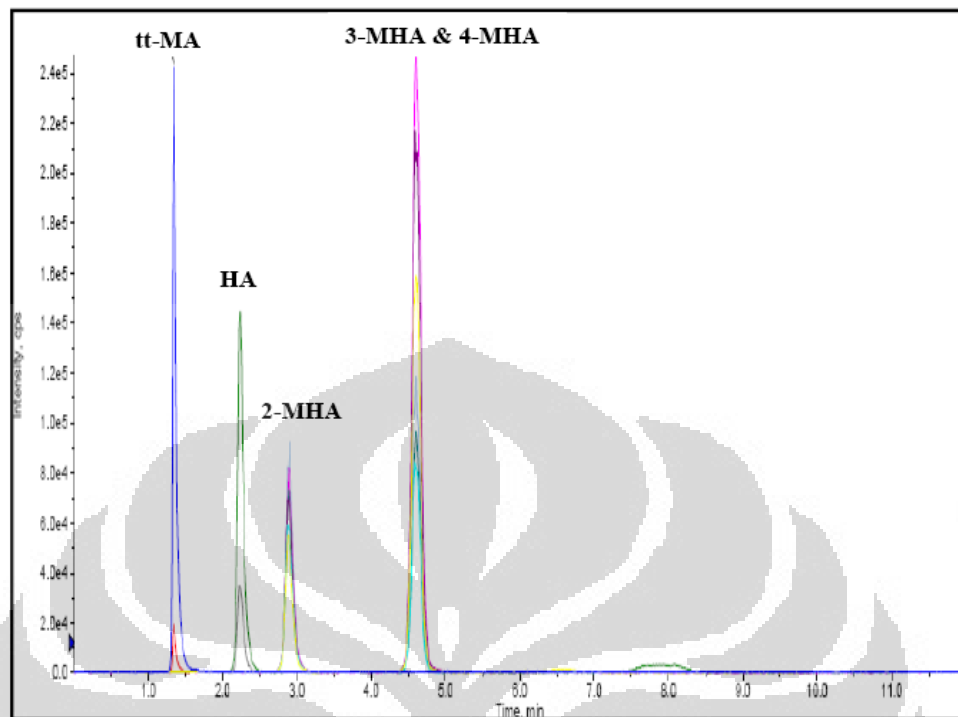


metanol dan campuran asam format
serta amonium asetat dalam air

asetonitril dan campuran asam asetat
glasial

Gambar 4.1 Perbandingan dua tipe fase gerak

Berdasarkan analisa yang dilakukan pada larutan standar yang mengandung campuran kelima senyawa ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA, diamati bahwa ttMA akan terelusi terlebih dahulu yang kemudian disusul oleh kemunculan HA, lalu 2-MHA, 3-MHA dan 4-MHA. Khusus untuk 3-MHA dan 4-MHA terelusi pada waktu yang bersamaan sehingga diperoleh peak yang saling berhimpit. Hal ini terjadi karena 3-MHA dan 4-MHA memiliki kepolaran yang tidak jauh berbeda. Keduanya merupakan metabolit dari para-xilena dan meta-xilena.



Gambar 4.2 Hasil pemisahan metabolit BTX

Pada 2-MHA diperoleh peak yang terelusi terlebih dahulu dibandingkan 3-MHA dan 4-MHA. Pada struktur senyawa asam metil hippurat terdapat ikatan benzena dengan gugus metil dan benzena dengan gugus amida serta karboksil. Gugus metil merupakan pendorong elektron yang akan mengaktivasi cincin benzena. Gugus metil cenderung menetralkan muatan positif cincin benzena dan menjadikan dirinya juga positif. Penyebaran muatan ini menstabilkan karbokation. Dengan cara yang sama, pengaruh induktif menstabilkan penyebaran muatan positif dalam keadaan transisi sehingga akan mempercepat reaksi. Sebaliknya, gugus amida dan karboksil merupakan penarik elektron yang akan mendeaktivasi cincin benzena. Gugus penarik elektron akan memperlambat kecepatan reaksi⁵⁷.

Masing-masing gugus akan membentuk vektor sehingga dapat diperoleh resultan vektor dari kedua gugus. Senyawa asam 2-metil hippurat merupakan metabolit dari orto-xilena. Posisi orto akan memberikan resultan vektor yang lebih besar dibandingkan dengan posisi meta dan para. Hal ini mengakibatkan kepolaran senyawa asam 2-metil hippurat lebih tinggi dibandingkan dengan asam 3-metil hippurat dan asam 4-metil hippurat. Asam trans, trans-mukonat terelusi

lebih awal dari kelima senyawa lainnya. Tingkat kepolaran yang tinggi dimiliki oleh senyawa tt-MA karena memiliki dua gugus karboksil, sehingga tt-MA akan mudah terionisasi dengan melepas atom hidrogen menjadi ion H^+ .

Asam hippurat akan terelusi pada posisi kedua setelah asam trans, trans-mukonat. Struktur asam hippurat memiliki gugus karboksil dan gugus amida. Gugus karboksil memberikan sifat asam yang ditentukan oleh mudahnya gugus -OH melepaskan ion hidrogen dari -OH pada alkohol. Gugus amida memberikan sifat basa. Gugus amida merupakan turunan asam karboksilat dengan kepolaran yang rendah. Hal ini dikarenakan unsur nitrogen yang kurang elektronegatif sehingga memiliki reaktivitas yang rendah⁵⁷. Keadaan ini yang mengakibatkan asam hippurat memiliki kepolaran di bawah asam trans, trans-mukonat.

4.2 Optimasi Kondisi LC-MS/MS

Analisis senyawa asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat dengan menggunakan LC-MS/MS dapat dilakukan dengan baik setelah memperoleh keadaan optimum dari setiap parameter yang berlaku pada instrumen LC-MS/MS. Untuk itu dilakukan optimasi pada spektrometer massa, sumber ion (*ion source*), dan kromatografi cair. Keadaan optimum setiap bagian instrumen dalam mendeteksi kelima senyawa sangat berpengaruh dalam pengukuran selanjutnya, hal tersebut yang mengharuskan pencarian kondisi optimum untuk masing-masing bagian.

4.2.1 Optimasi Kondisi Spektrometer Masa

Optimasi kondisi spektrometer massa dilakukan untuk memperoleh fragmentasi (/) yang maksimum dari masing-masing senyawa. Proses optimasi dilakukan menggunakan larutan baku dengan konsentrasi yang sama yakni 0.5 ppm. Optimasi dilakukan untuk setiap senyawa, tidak dalam kondisi campuran. Larutan baku yang telah disaring dengan filter nylon 0.45 μ L dimasukkan ke dalam syringe pump, kemudian dilakukan injeksi dengan mode polarisasi negatif. Instrumen spektrometer masa memiliki parameter yang harus dipenuhi untuk memperoleh keadaan optimum, dimana analit dapat terdeteksi dengan baik dan mampu memberikan informasi fragmentasi (/) dari masing-masing senyawa.

Parameter tersebut antara lain *declustering potential* (DP), *enterance potential* (EP), *collision energy* (CE), dan *collision cell exit potential* (CXP).

Declustering potential (DP) merupakan beda potensial antara dasar dengan pelat. Digunakan untuk meminimalkan ion kluster pelarut, yang mungkin menempel pada sampel. Tegangan semakin tinggi semakin besar jumlah fragmentasi. *Enterance potential* (EP) merupakan tegangan yang digunakan untuk memfokuskan ion ketika melalui daerah Q0 yang bertekanan tinggi. *Collision energy* (CE) adalah energi yang di terima ion prekursor untuk dipercepat masuk ke dalam sel tabrakan. *Collision cell exit potential* (CXP) merupakan tegangan yang berguna untuk mengeluarkan ion dari Q3 untuk masuk ke detektor ion. Berdasarkan hasil dari penelitian yang telah dilakukan, nilai optimum dimana setiap parameter dari instrumen spektrometer massa memberikan kondisi yang baik untuk proses fragmentasi kelima senyawa pada Q1 dan Q3. Hasil optimasi spektrometer massa untuk kelima senyawa dapat dilihat dalam Tabel 4.1.

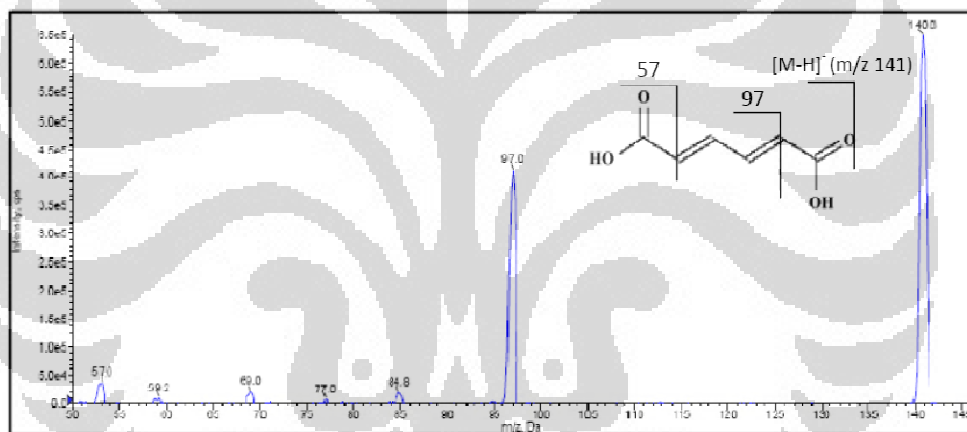
Tabel 4.1 Kondisi optimum spektrometer massa

Nama Senyawa	Q ₁	Q ₃	DP	EP	CE	CXP
Asam trans,trans-mukanoat	140.882	96.965	-25	-7.5	-8	0
	140.882	57.000	-25	-7.5	-14	0
Asam Hippurat	177.928	134.100	-30	-4	-12	-2
	177.928	76.900	-30	-4	-20	0
Asam 2-metil Hippurat	191.898	91.100	-40	-4.5	-18	0
	191.898	148.00	-40	-4.5	-12	-2
Asam 3-metil Hippurat	191.917	90.9	-35	-9.5	-18	0
	191.917	148.00	-35	-9.5	-12	-2
Asam 4-metil Hippurat	192.090	91.9	-45	-10	-22	-2
	192.090	148.00	-45	-10	-12	-2

Berdasarkan keadaan optimum dari instrumen spektrometer massa akan diperoleh data dari Q1 yang menghasilkan nilai / ion prekursor dan data dari Q3 yang menghasilkan nilai / ion produk. Ion prekursor merupakan induk ion

dari senyawa, dapat diperkirakan nilainya dengan mengurangi satu atau menambah satu berat molekul dari tiap senyawa. Dalam penelitian diketahui bahwa kelima senyawa memiliki mode polarisasi negatif, sehingga ion prekursor diperoleh dengan mengurangi satu berat molekul dari tiap senyawa.

Ion produk dihasilkan dari pecahan ion prekursor. Pecahan ion prekursor umumnya terletak pada molekul yang tidak stabil, mudah terlepas. Pada instrumentasi LC-MS/MS dibutuhkan minimal dua ion produk dengan intensitas tertinggi. Hal ini berguna untuk informasi yang bersifat kuantisasi dimana senyawa dengan berat molekul tersebut terdeteksi oleh alat dalam bentuk peak, dan untuk konfirmasi bahwa peak yang dihasilkan benar-benar milik senyawa yang diinginkan.

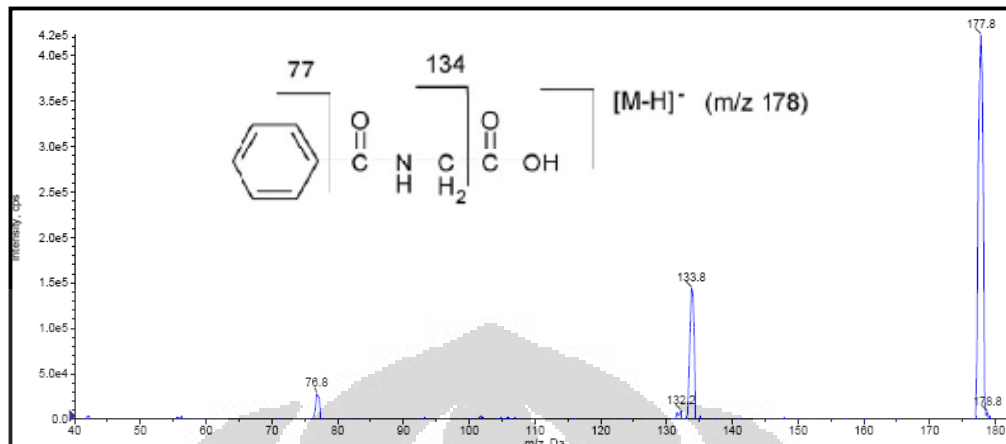


Gambar 4.3 Ion prekursor dan ion produk asam trans, trans-mukonat

Asam trans, trans-mukonat terdeteksi oleh Q1 sehingga menghasilkan nilai ion prekursor / 141 yang selanjutnya terfragmentasi pada Q3 sehingga menghasilkan ion produk dengan intensitas tertinggi pada / 97 dan / 57.00.

Fragmentasi terjadi karena putusnya ikatan yang bersebelahan dengan C=O. Pecahan juga terjadi pada tiap ikatan C-C dengan tetap menjaga muatan pada bagian yang mengandung oksigen maupun pada bagian alkil.

Asam trans, trans-mukonat memiliki dua gugus karboksilat sehingga dapat disebut sebagai asam dikarboksilat. Dalam pelarut air, sebagian molekul akan terionisasi dengan melepas atom hidrogen menjadi ion H⁺.



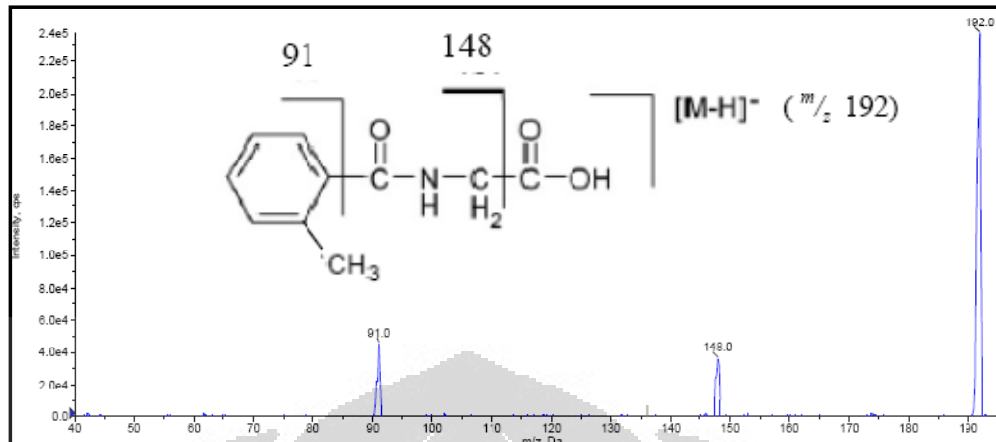
Gambar 4.4 Ion produk dan ion prekursor Asam Hippurat

Gambar 4.4 menunjukkan spektrum massa ion produk dan ion prekursor dari asam hippurat. Dalam gambar tercatat spektrum masa ion produk dalam mode ion negatif. Dari ion perkursor / 178 diperoleh fragmentasi dengan intensitas tertinggi pada / 134 dan / 77.

Asam hippurat memiliki gugus amida dan karboksil. Fragmentasi terjadi karena ikatan C-C yang bersebelahan dengan atom oksigen terputus, dengan muatan yang tinggal bersama bagian yang teroksidasi. Salah satu rantai benzena terikat pada gugus C=O akan mengalami pemutusan ikatan C-C yang disertai dengan migrasi hidrogen sesaat setelah terjadi pemutusan ikatan.

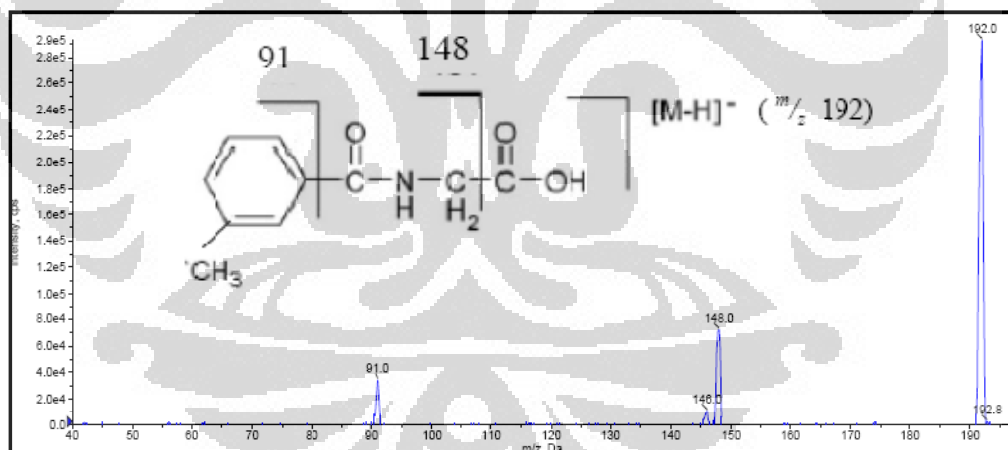
Fragmentasi juga terjadi pada ikatan dengan gugus karboksil, dimana gugus karboksil akan terpisah dari senyawa inti dengan pecahan terletak pada ikatan C-C disebelah ikatan C=O

Pada asam metil hippurat, fragmentasi terjadi tidak jauh berbeda dengan asam hippurat. Hal ini terjadi karena hanya dipengaruhi oleh penambahan satu gugus metil pada gugus benzena. Asam metil hippurat dengan berbagai posisi metil pada gugus benzena memiliki / yang tidak jauh berbeda, yang dapat terlihat dari peak fragmentasi / pada Gambar 4.5.



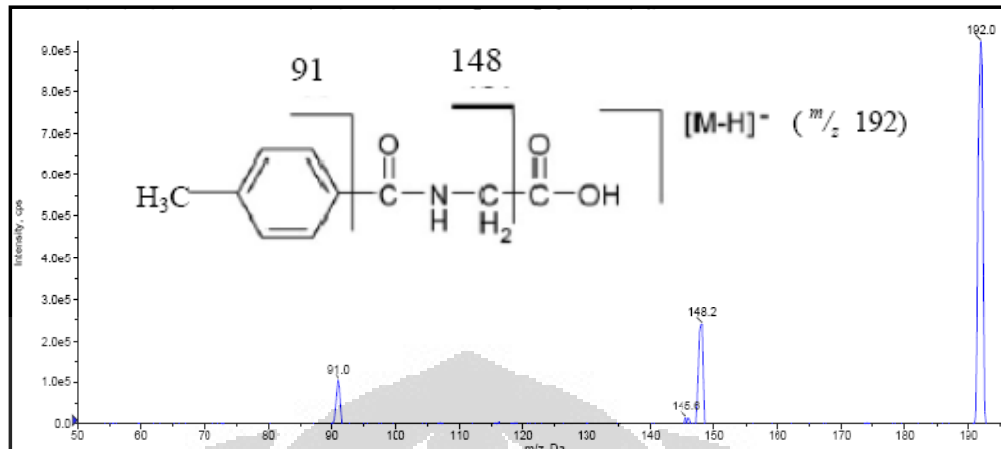
Gambar 4.5 Ion produk dan ion prekursor asam 2-metil hippurat

Pada Gambar 4.4 dapat dilihat spektrum masa produk ion dan prekursor ion dari asam 2-metil hippurat. Dalam gambar tercatat spektrum masa ion produk dalam mode ion negatif. Dari ion prekursor 192 diperoleh fragmentasi dengan intensitas tertinggi pada 91 dan 148.



Gambar 4.6 Ion Produk dan Ion Prekursor Asam 3-metil Hippurat

Pada Gambar 4.6 dapat dilihat spektrum masa produk ion dan prekursor ion dari asam 3-metil hippurat. Dalam gambar tercatat spektrum masa ion produk dalam mode ion negatif. Dari ion prekursor 192 diperoleh fragmentasi dengan intensitas tertinggi pada 91 dan 148.



Gambar 4.7 Ion produk dan ion Prekursor Asam 4-metil Hippurat

Pada Gambar 4.7 dapat dilihat spektrum masa produk ion dan prekursor ion dari asam 4-metil hippurat. Dalam gambar tercatat spektrum masa ion produk dalam mode ion negatif. Dari ion perkursor / 192 diperoleh fragmentasi dengan intensitas tertinggi pada / 91 dan / 148.

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka dapat disimpulkan setiap senyawa telah memiliki dua ion produk dengan intensitas tertinggi. Hasil ini dapat digunakan untuk indentifikasi dan konfirmasi kelima senyawa ketika dilakukan pengamatan dalam sampel urin.

4.2.2 Optimasi Kondisi Sumber Ion (*Ion Source*)

Kondisi sumber ion (*ion source*) diatur sedemikian rupa dengan cara memvariasikan beberapa parameter guna mendapatkan kondisi terbaik bagi kelima senyawa sehingga mampu mengion dan mampu memisahkan ion molekul analit dari pelarutnya. Adapun parameter-parameter tersebut antara lain adalah *curtain gas* (CUR), *collision gas* (CAD), *ion spray votage* (IS), suhu (TEM), nebulizer gas 1 (GS1) dan nebulizer gas 2 (GS2).

Curtain gas (CUR) merupakan gas yang dikondisikan untuk mencegah tetesan pelarut masuk dan mencemari optik ion. *Collision gas* (CAD) berguna untuk mencegah kontaminasi ion optik. *Ion spray voltage* (IS) merupakan tegangan yang dialirkan untuk jarum pengionisasi sampel pada sumber ion. Suhu (TEM) adalah suhu yang diatur sedemikian rupa pada gas turbo. Nebulizer gas 1

(GS1) berfungsi untuk membantu menghasilkan tetesan kecil dari aliran sampel. Nebulizer gas 2 (GS2) merupakan gas turbo, yang berguna membantu menguapkan tetesan semprotan sampel dan mencegah pelarut memasuki sistem.

Tabel 4.2 Kondisi optimum sumber ion (*ion source*)

CUR	35
CAD	Medium
IS	-4500
TEM	500
GS1	55
GS2	55

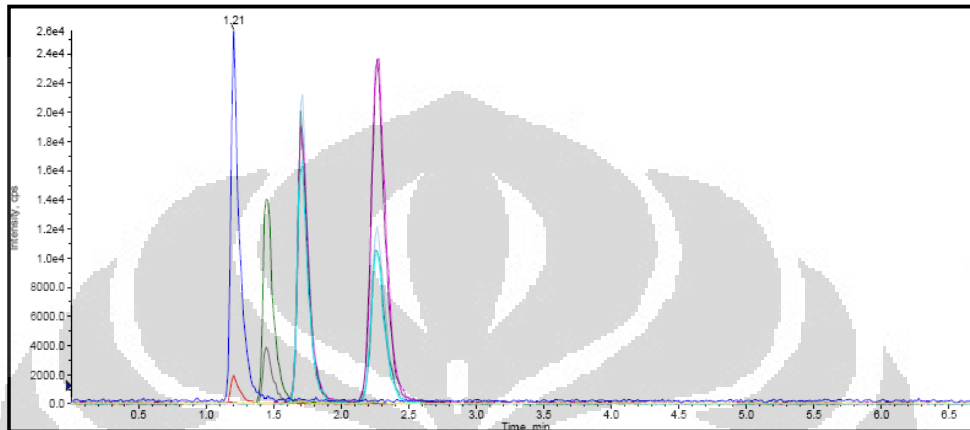
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, dengan menggunakan kondisi sumber ion seperti Tabel 4.2 seluruh analit mampu mengion dan mampu memisahkan ion molekul analit dari pelarut. Hal ini teruji dengan terdeteksinya setiap senyawa pada analisa masa Q1 dan Q3

4.2.3 Optimasi Kromatografi Cair

Fase gerak sangat berpengaruh untuk mendapatkan keadaan optimum kolom dalam melakukan analisis. Sesuai dengan prosedur NIOSH 8301 peneliti menggunakan fase gerak pertama yang mengandung asam asetat glasial dalam air dengan fase gerak kedua asetronitril. Dengan menurunnya konsentrasi asam asetat glasial dalam air yang secara otomatis akan meningkatkan konsentrasi asetonitril akan memberikan respon yang baik terhadap kelima senyawa.

Peneliti juga melakukan percobaan dengan menggunakan sistem isokratik pada elusi fase gerak. Namun peak yang dihasilkan tidak mampu melakukan pemisahan dengan baik. Kepolaran yang berlebih akan memberikan gangguan

kepada kelima senyawa untuk melakukan pemisahan sehingga terelusi pada waktu yang hampir bersamaan yang menghasilkan peak yang saling berhimpit. Dapat disimpulkan bahwa pemakaian sistem gradien pada elusi fase gerak memberikan hasil yang optimum.



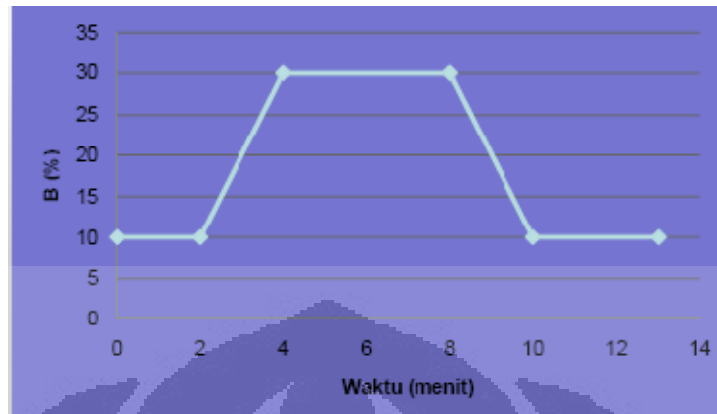
Gambar 4.8 Pemisahan dengan elusi isokratik 30% asetonitril

Pemisahan yang baik dihasilkan dengan penggunaan sistem gradien pada elusi fase gerak. Sistem gradien diberlakukan pada volume asetonitril dengan perincian sesuai dengan Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Gradien eluen asetonitril 10%-30%

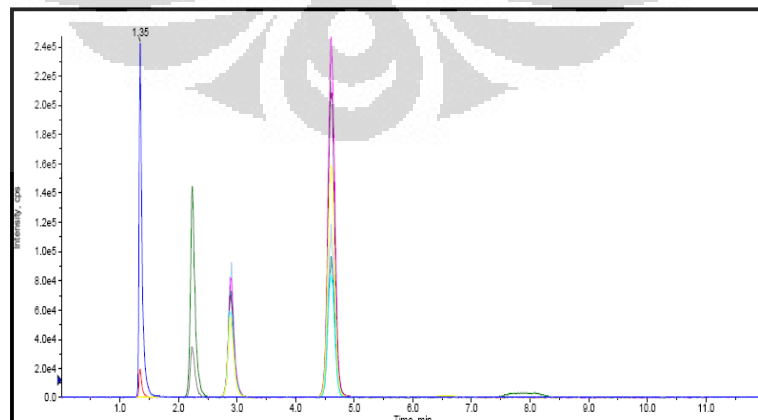
Waktu (menit)	B(%)
0.01	10
2	10
4	30
8	30
10	10
13	10

Gradien eluen ini akan menghasilkan tampilan grafik sebagai berikut



Gambar 4.9 Grafik gradien eluen asetonitril 10%-30%

Sistem gradien pada fase gerak memberikan kepolaran yang sesuai dengan kebutuhan analit. Asam trans, trans-mukonat memiliki dua gugus karboksil. Dalam pelarut air, kepolaran akan meningkat karena sebagian molekul akan terionisasi dengan melepas atom hidrogen. Sedangkan asam hippurat memiliki satu gugus karboksil sehingga membutuhkan volume air yang lebih sedikit. Hal yang sama juga berlaku untuk asam metil hippurat. Bila volume air yang diberikan pada kelima analit disamakan maka akan dihasilkan peak yang berhimpit dan berdekatan karena terjadi kelebihan kepolaran pada asam hippurat dan asam metil hippurat. Sistem gradien mampu memberikan pemisahan pada kelima analit dengan waktu elusi di bawah 5 menit dan intensitas yang cukup baik, dapat dilihat pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Pemisahan dengan gradien elusi 10%-30% asetonitril

4.3 Metode Validasi

Validasi metode LC-MS/MS dilakukan kepada senyawa tt-MA, HA, MHA, 3-MHA, dan 4-MHA setelah memperoleh keadaan optimum pada setiap bagian instrumen LC-MS/MS. Pada pengujian sampel, dilakukan kegiatan ekstraksi untuk memisahkan senyawa analit dari matriks urin yang tidak diinginkan. Perlakuan ekstraksi yang sama juga diberikan kepada larutan standar untuk memperoleh persamaan yang mewakili perlakuan terhadap sampel.

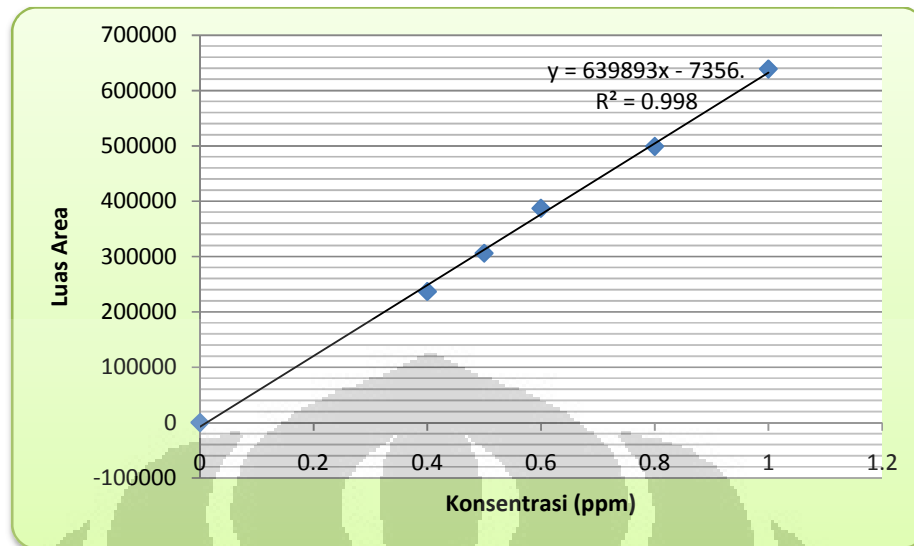
4.3.1 Linearitas dan Rentang

Berdasarkan pengukuran terhadap luas area dari larutan standar tanpa ekstraksi maupun dengan ekstraksi asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat pada rentang konsentrasi 0.1 ppm – 1 ppm dengan pengulangan sebanyak 7 kali untuk setiap standar, maka diperoleh persamaan garis lurus dengan $R^2 \geq 0.996$ seperti terlihat pada Tabel 4.4.

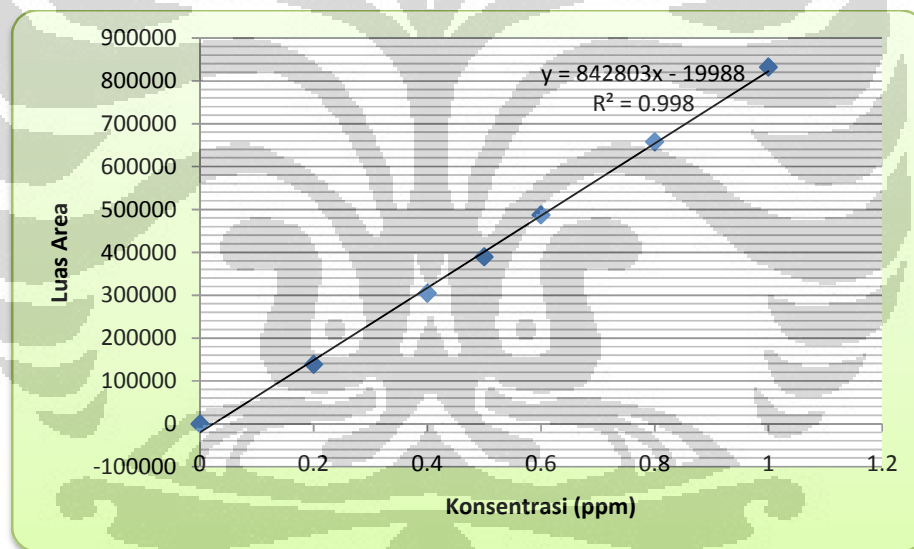
Tabel 4.4 Koefisien korelasi dengan maupun tanpa perlakuan ekstraksi

Nama Senyawa	R^2	
	Ekstraksi	Tanpa Ekstraksi
tt-MA	0.998	0.998
HA	0.998	0.998
2-MHA	0.997	0.998
3-MHA	0.996	0.999
4-MHA	0.999	0.998

Secara keseluruhan dapat disimpulkan perlakuan ekstraksi akan mengurangi nilai koefisien korelasi. Hal tersebut dapat disebabkan karena adanya matriks analit yang hilang pada proses ekstraksi sehingga mengakibatkan linearitas pada senyawa menurun. Kurva linearitas kelima senyawa dengan perlakuan ekstraksi atau tanpa perlakuan ekstraksi dapat dilihat pada lampiran 1 dan lampiran 2. Berikut salah satu kurva linearitas dari kelima senyawa dengan perlakuan ekstraksi maupun tanpa perlakuan ekstraksi.



Gambar 4.11 Kurva linearitas ekstraksi asam trans, trans-mukonat



Gambar 4.12 Kurva linearitas asam trans, trans-mukonat

Dapat diamati dengan jelas pada Gambar 4.11 dan 4.12 dengan adanya perlakuan ekstraksi akan memberikan pengaruh pada deteksi senyawa terhadap instrumen. Tanpa perlakuan ekstraksi senyawa asam trans, trans-mukonat masih dapat terdeteksi pada konsentrasi 0.2 ppm. Namun dengan adanya perlakuan ekstraksi senyawa asam trans, trans-mukonat hanya dapat terukur dengan baik pada konsentrasi 0.4 ppm.

4.3.2 Presisi

Nilai presisi yang dinyatakan dengan persentase parameter standar deviasi relatif (%RSD) dimana kriteria seksama diperoleh jika metode memberikan simpangan baku relatif kurang $\leq 16\%$. Uji presisi yang dilakukan merupakan *repeatability* atau uji keterulangan dengan melakukan pengukuran terhadap luas area secara berulang sebanyak 7 kali pengulangan pada kondisi yang sama untuk masing-masing larutan asam trans, trans-mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat.

Tabel 4.5 Nilai %RSD dengan perlakuan ekstraksi dan tanpa perlakuan ekstraksi

Senyawa	%RSD ekstraksi	%RSD Tanpa ekstraksi
tt-MA	2,581	2,731
HA	1,257	2,039
2-MHA	2,326	0,784
3-MHA	3,258	2,906
4-MHA	3,272	3,086

Berdasarkan data tersebut dapat disimpulkan bahwa pengukuran presisi yang dilakukan memenuhi kriteria seksama atau dengan kata lain presisi pengukurannya sangat baik. Hasil analisis luas area dari masing-masing larutan standar disajikan dalam bentuk tabel pada lampiran 3.

4.3.3 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantisasi (LOQ)

Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi dari ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA dilakukan pada pengukuran dari masing-masing larutan standar dengan rentang konsentrasi 0 ppm hingga 1 ppm dengan pengulangan sebanyak 7 kali untuk setiap konsentrasi larutan standar. Dari hasil perhitungan (ada pada lampiran) diperoleh batas deteksi (LOD) 0,035 ppm – 0,065 ppm dan batas kuantifikasi (LOQ) 0,117 ppm – 0,218 dengan penambahan perlakuan ekstraksi seperti pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) standar dengan perlakuan ekstraksi

Senyawa	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
tt-MA	0,048	0,161
HA	0,043	0,142
2-MHA	0,055	0,183
3-MHA	0,065	0,218
4-MHA	0,035	0,117

Berdasarkan perhitungan (ada pada lampiran) diperoleh juga nilai batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) tanpa perlakuan ekstraksi pada larutan tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA dengan rentang konsentrasi 0,036 ppm – 0,048 ppm untuk nilai LOD dan 0,121 ppm – 0,159 ppm untuk nilai LOQ.

Tabel 4.7 Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) standar tanpa perlakuan ekstraksi

Senyawa	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
tt-MA	0,048	0,159
HA	0,040	0,134
2-MHA	0,043	0,145
3-MHA	0,036	0,121
4-MHA	0,047	0,158

4.3.4 Persen Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Persen perolehan kembali sangat penting dilakukan guna menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya sebagai salah satu parameter keandalan metode. Persen perolehan kembali dilakukan dengan metode penambahan baku atau *spiking* yaitu dengan menambahkan campuran larutan standar 100 μ L dengan konsentrasi ke dalam 1 mL sampel. Selanjutnya sampel mengalami proses ekstraksi dengan perlakuan yang sama dengan sampel

tanpa penambahan larutan standar. Berikut hasil persen *recovery* sampel dengan kadar sampel terlampir pada lampiran 15.

Tabel 4.8 Nilai persen *recovery* sampel

Sampel	tt-MA	HA	2-MHA	3-MHA	4-MHA
1	97.409	95.215	96.072	85.171	88.818
2	93.140	97.645	95.854	90.969	90.713
3	99.168	99.948	89.025	91.161	93.226
4	92.219	97.236	93.263	90.315	99.072
5	93.174	91.773	96.297	92.885	98.612
6	96.477	98.571	94.346	93.313	90.000
7	99.279	99.700	92.819	98.551	98.519

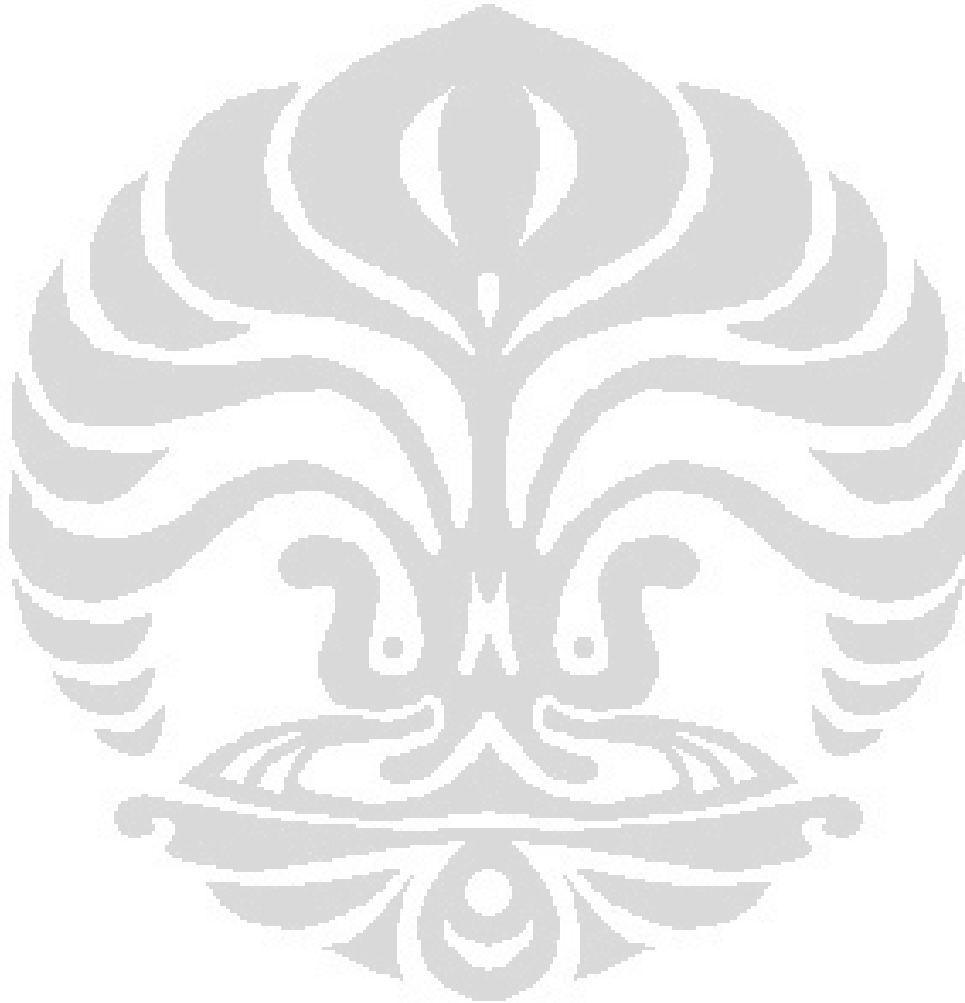
Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 4.8 dapat dilihat persen perolehan kembali metode LC-MS/MS untuk penentuan asam trans, trans mukonat, asam hippurat, asam 2-metil hippurat, asam 3-metil hippurat, dan asam 4-metil hippurat dengan perlakuan ekstraksi berada pada kisaran 85 % - 99%. Dapat disimpulkan bahwa efisiensi proses preparasi dan pengujian sampel terbilang cukup baik

4.4 Analisis ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA Pada Sampel

Dari 7 sampel yang diambil secara acak dari pekerja ditentukan kadar metabolit BTX di dalam tubuh yaitu ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA yang terkandung didalam sampel. Sebelum dianalisa kadarnya dengan instrumen LC-MS/MS, pada sampel urin dilakukan *treatment* terlebih dahulu untuk mengurangi komponen-komponen lain yang tidak dibutuhkan dalam matriks sampel. *Treatment* terhadap sampel dilakukan dengan mengekstraksi sampel dengan menggunakan asam klorida, natrium klorida, dan etil asetat.

Berdasarkan hasil analisa kualitatif yang dilakukan terhadap sampel-sampel tersebut, terbukti bahwa di dalam sampel terdeteksi senyawa tersebut. Namun tidak semua sampel mengandung kelima senyawa metabolit BTX, hal tersebut dimaklumkan tergantung besarnya paparan BTX di dalam sampel.

Sementara berdasarkan analisa kuantitatif terhadap sampel-sampel tersebut, teramati bahwa asam hippurat terkandung dalam semua sampel dengan kadar yang cukup tinggi. Kadar BTX yang terkandung dalam sampel-sampel uji tersebut sangat bervariasi seperti disajikan dalam lampiran 14. Kadar BTX yang terkandung dalam sampel berada pada kisaran 0.04 ppm – 46,21 ppm. Dengan konsentrasi tertinggi dimiliki oleh asam hippurat.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

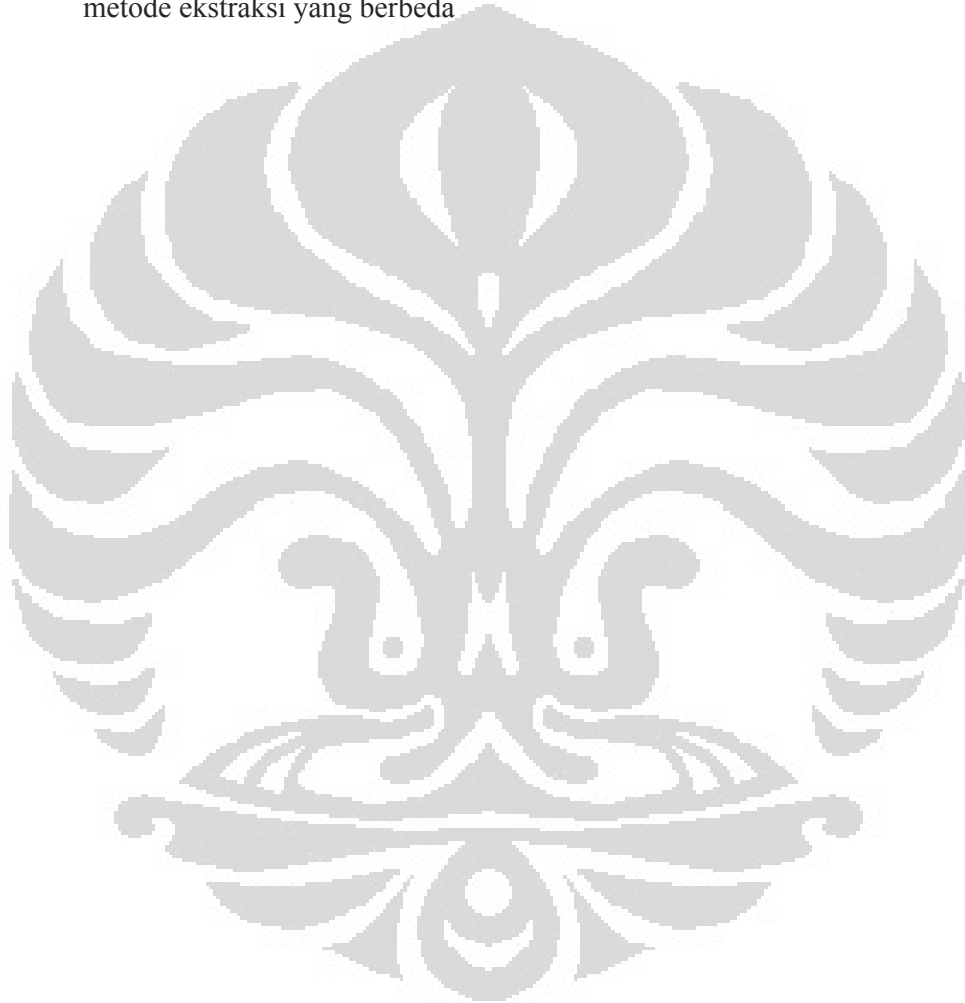
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka kesimpulan mengenai hasil penelitian ini antara lain :

- a. Ion perkursor / 141 diperoleh fragmentasi tt-MA dengan intensitas tertinggi pada / 97 dan / 57. Dari ion perkursor / 178 diperoleh fragmentasi HA dengan intensitas tertinggi pada / 134 dan / 77. Dari ion perkursor / 192 diperoleh fragmentasi 2-MHA dengan intensitas tertinggi pada / 91 dan / 148. Dari ion perkursor / 192 diperoleh fragmentasi 3-MHA dengan intensitas tertinggi pada / 91 dan / 148. Dari ion perkursor / 192 diperoleh fragmentasi 4-MHA dengan intensitas tertinggi pada / 91 dan / 148.
- b. Uji presisi kelima senyawa metabolit dengan metode keterulangan memberikan %RSD < 16 %
- c. LOD dan LOQ dengan penambahan perlakuan ekstraksi pada larutan standar ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA dengan rentang konsentrasi 0,035 ppm hingga 0,218 ppm
- d. LOD dan LOQ tanpa perlakuan ekstraksi pada larutan tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA dengan rentang konsentrasi 0,036 ppm hingga 0,159 ppm.
- e. Berdasarkan hasil analisa kualitatif yang dilakukan terhadap sampel-sampel tersebut, teramati bahwa sebagian besar sampel mengandung metabolit BTX di dalam urin.
- f. Berdasarkan hasil analisis kuantitatif terhadap sampel urin, kadar ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA yang terkandung dalam sampel berkisar antara 0,04 ppm – 46,21 ppm.
- g. Nilai persen recovery sampel mampu mencapai kisaran 85 % - 99 %

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini maka saran yang dikemukakan oleh penulis adalah :

Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap penentuan kadar ttMA, HA, 2-MHA, 3-MHA, dan 4-MHA dalam urin melalui teknik LC-MS/MS dengan variasi parameter lainnya seperti tipe aliran fasa gerak, jenis fasa gerak dan metode ekstraksi yang berbeda



DAFTAR PUSTAKA

1. Dean, B.J (1985) Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylene and phenols. *Mutat. Res.*, 145, 153-181.
2. Lee BL, New AL, Kok PW, Ong HY (1993) Urinary trans, trans-muconic acid determined by liquid chromatography: application in biological monitoring of benzene exposure. *Clin Chem* 39:1788-1792.
3. Inoue O, Seiji K, Nakasuka H, Watanabe T, Yin SN, Li GL, Cai SX, Jin C, Ikeda M. Urinary ttMA: muconic acid as an indicator of exposure to benzene. *Brit J Indust Med* 1989;46:122-124.
4. Nise, G., (1992) Urinary excretion of o-Cresol and hippuric acid after toluene exposure in rotogravure printing. *Intl. Arch. Occup. Environ. Health* 63: 377-81
5. George T. Motock, James B. Perkins, dan John M. Reynolds (2003). Hippuric and methyl hippuric acids in urine, Method 8031, Issue 3. NIOSH Manual of Analytical Methods, 4th edition. DataChem Laboratories, Inc., Salt Lake City, Utah 84123, under NIOSH contract CDC-200-2001-08000.
6. L. Perbellini, N. Veronese, A. Princivalle, *J. Chromatogr. B* (2002) *Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 781 269.
7. H. Moriwaki, Y. Tsujimoto, T. Noda, M. Shimizu, M. Tanaka (2000) *Analyst* 125,715.
8. Q. Qu, A.A. Melikian, G. Li, R. Shore, L. Chen, B. Cohen, S. Yin, M.R. Kagan, H. Li, M. Meng, X. Jin, W. Winnik, Y. Li, R. Mu, K. Li, *Am. J. Ind. Med.* 37 (2000) 522.
9. L.C. Lin, Y.C. Tyan, T.S. Shih, Y.C. Chang, P.C. Liao, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1310.
10. L.C. Lin, J.F. Shih, T.S. Shih, Y.J. Li, P.C. Liao, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2743.
11. P.C. Liao, C.M. Li, L.C. Lin, C.W. Hung, T.S. Shih, *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002) 205.

12. O. Inoue, E. Kanno, T. Yusa, M. Kakizaki, H. Ukai, S. Okamoto, K. Higashikawa, M. Ikeda, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75 (2002) 341.
13. A. Barbieri, L. Sabatini, A. Accorsi, A. Roda, F.S. Violante, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 1983.
14. Laura Sabatini, Anna B, Paolo I, Stefano M, Francesco SV (2008) Validation of an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of phenylmercapturic acid, benzylmercapturic acid and o-methylbenzyl mercapturic acid in urine as biomarkers of exposure to benzene, toluene, and xylenes. *Journal of Chromatography B*, 863: 115-122.
15. International Agency for Research on Cancer. 1982. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol.29. Benzene.
16. IPCS Inchem, 1993.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc150.htm>, 24 Januari 2012 pk. 23:30.
17. IARC (1989) Occupational exposures in petroleum refining; crude oil and major petroleum fuels. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 322 pp (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 45).
18. Reynolds LF & Harrison DW (1982) Study of discharges of: benzene, chloroform and carbon tetrachloride into the aquatic environment and the best technical means for the reduction of water pollution from such discharges. Final Report. Brussels, Commission of the European Communities (BL/A/2198).
19. Johansson I & Ingelman-Sundberg M (1988) Benzene metabolism by ethanol-, acetone-, and benzene-inducible cytochrome P-450(IIE1) in rat and rabbit liver microsomes. *Cancer Res*, 48: 5387-5390.
20. Nakajima T, Elovaara E, Park SS, Gelbain HV, Hietanen E, & Vainio H (1990) Monoclonal antibody-directed characterization of benzene, ethoxy-resorufin and pentoxy-resorufin metabolism in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 40: 1255-1261.

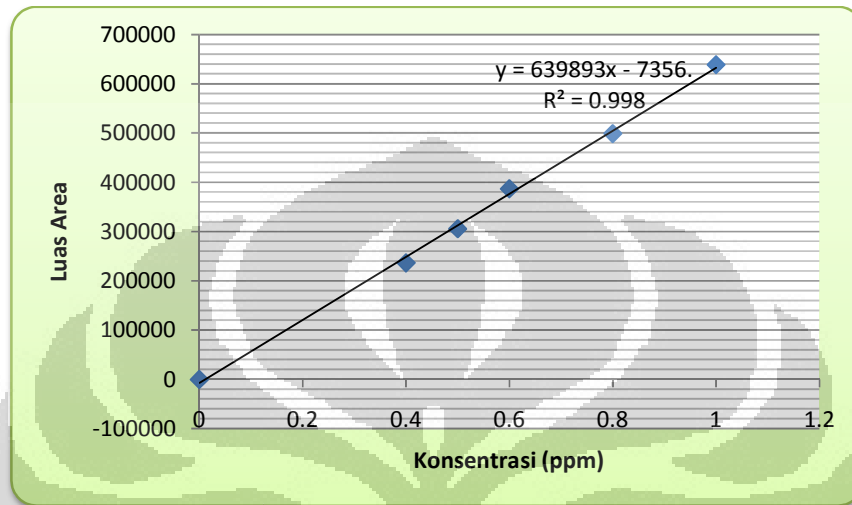
21. Chepiga TA, Yang CS, & Snyder R (1991) Benzene metabolism in two purified, reconstituted rat hepatic mixed function oxidase systems. In: Witmer CM, Snyder R, Jollow DJ, Kalf GF, Kocsis JJ, & Sipes IG ed. Biological reactive intermediates: IV. Molecular and cellular effects and their impact on human health. New York, London, Plenum Press, pp 261-265.
22. Kalf GF (1987) Recent advances in the metabolism and toxicity of benzene. *CRC Crit Rev Toxicol*, 18: 141-159.
23. Gollmer L, Graf H, & Ulrich V (1984) Characterization of the benzene monooxygenase system in rabbit bone marrow. *Biochem Pharmacol*, 33: 3597-3602.
24. Latriano L, Goldstein BD, & Witz G (1986) Formation of muconaldehyde, an open-ring metabolite of benzene, in mouse liver microsomes: an additional pathway for toxic metabolites. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 83: 8356-8360.
25. Kirley TA, Goldstein BD, Maniara WM, & Witz G (1989) Metabolism of trans,trans-muconaldehyde, a microsomal hematotoxic metabolite of benzene by purified yeast aldehyde dehydrogenase and a mouse liver soluble fraction. *Toxicol Appl Pharmacol*, 100: 360-367.
26. Puspasari, Septiana Dwi (2009) Studi deteksi asam S-fenil merkapturat sebagai biomarker paparan benzena pada petugas beberapa stasiun pengisian bahan bakar umum (SPBU) di Jakarta. Departemen Kimia FMIPA UI, Depok.
27. Ong CH, Kok PW, Ong HY, Shi CY, Lee BL, Phoon WH, Tan KT (1996) Biomarkers of exposure to low concentration of benzene: a field assessment. *Occup Environ Med* ;53:328-333.
28. Boogaard PJ, van Sittert NJ (1995) Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between Sphenylmercapturic acid, trans,trans - muconic acid, and phenol. *Occup Environ Med*;52:611-620.
29. IPCS-WHO-ILO (1985) *Toluene*. Environmental Health Criteria 52, by Dr K.S. Channer *et.al*.

30. US NIOSH (1973) Criteria for a recommended standard. Occupation exposure to toluene, US National Institute for Occupational Safety and Health, 108 pp (HSM 73-11023, US DHEW, NTIS No. PB-222-219/8).
31. IPCS Inchem, 1985.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc52.htm>, 26 Januari 2012
32. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2007.
Public Health Statement of Toluene Toxicity. (<http://www.atsdr.cdc.gov>).
33. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2000.
Toxicological profile for Toluene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (<http://www.atsdr.cdc.gov>)
34. IKEDA, M. (1974) Reciprocal metabolic inhibition of toluene and trichloroethylene in vivo and in vitro. *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 33(2): 125-130.
35. Pacific Toxicology Laboratories (2003). Human toxic chemical exposure, *The Bulletin of Pacific Toxicology Laboratories*, www.pactox.com/toluene.htm
36. IPCS Inchem, 1992.
<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/xylene.htm> , 26 Januari 2012
37. IARC (1989) Xylene. In: *Some organic solvents, resin monomers and related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, pp 125-156 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 47).
38. OSHA.
<http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/xylene/recognition.html> , 26 Januari 2012
39. NIOSH (1988). *Recommendations for occupational safety and health standards*. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health. DHHS (NIOSH) Publication No. 88-111.

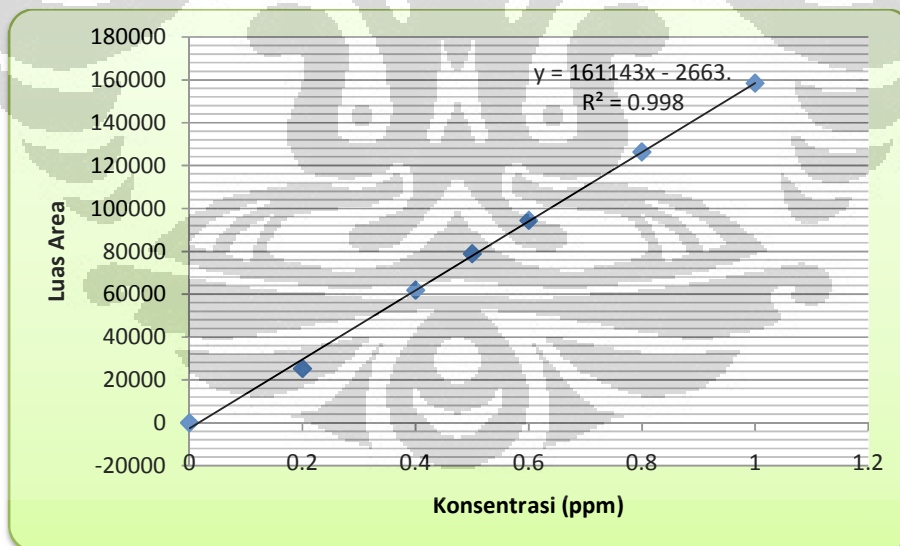
40. ACGIH (1988) TLVs. Threshold limit values and biological exposure indices for 1988-1989. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
41. Sedivec V & Flek J (1976) The absorption, metabolism, and excretion of xylenes in man. *Int Arch Occup Environ Health*, 37: 205-217.
42. Riihimäki V, Pfäffli P, & Savolainen K (1979a) Kinetics of *m*-xylene in man: Influence of intermittent physical exercise and changing environmental concentrations on kinetics. *Scand J Work Environ Health*, 5: 232-248.
43. Riihimäki V, Pfäffli P, Savolainen K, & Pekari K (1979b) Kinetics of *m*-xylene in man: General features of absorption, distribution, biotransformation and excretion in repetitive inhalation exposure. *Scand J Work Environ Health*, 5: 217-231.
44. Riihimäki V (1979a) Conjugation and urinary excretion of toluene and *m*-xylene in man. *Scand J Work Environ Health*, 5: 135-14.
45. Ghanayem, B.I., Burka, L.T., Matthews, H.B., 1987. Metabolic basis of ethylene glycol monobutyl ether (2-butoxyethanol) toxicity: role of alcohol and aldehyde dehydrogenases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 222–231.
46. Herold, D.A., Keil, K., Bruns, D.E., 1989. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 38, 73–76.
47. Moslen, M.T., Kaphalia, L., Balasubramanian, H., Yin, Y.M., Au, W.W., 1995. Species differences in testicular and hepatic biotransformation of 2-methoxyethanol. *Toxicology* 96, 217–224.
48. Tassaneeyakul, W., Birkette, D.J., Edwards, J.W., Veronense, M.E., Tassaneeyakul, W., Tukey, R.H., Miners, J.O., 1996. Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and *o*-, *m*- and *p*-xylene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276, 101–108
49. Harmita. (2004). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol.I, No 3:117-135

50. Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., and Zhang, X-M., 2004, Analytical Method Validation and Instrument performance Verification, Wiley Interscience, A John Wiley and Sons, New York, USA.
51. WHO. (1992). *The International Pharmacopoeia*. Fourth Edition. Electronic Version Geneva: World Health Organization
52. Swartz, M.E., and Krull, I.S., 1997, Analytical Method Development and Validation, Marcell Dekker, USA.
53. Michael Vogeser, Christoph Seger. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for further development. *Clinical Biochemistry Rev* 2008; 41; 649-662.
54. Bowers LD. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry: state of the art for the drug analysis laboratory. *Clin Chem* 1989;35: 1282–7.
55. Covey TR, Lee ED, Henion JD. High-speed liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of drugs in biological samples. *Anal Chem* 1986;58:2453–60.
56. Agilent Technologies, (2001), Agilent LC-MS Primer. U.S.A 5988-2045EN.
57. Riswiyanto. (2009). *Kimia Organik*. Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Indonesia

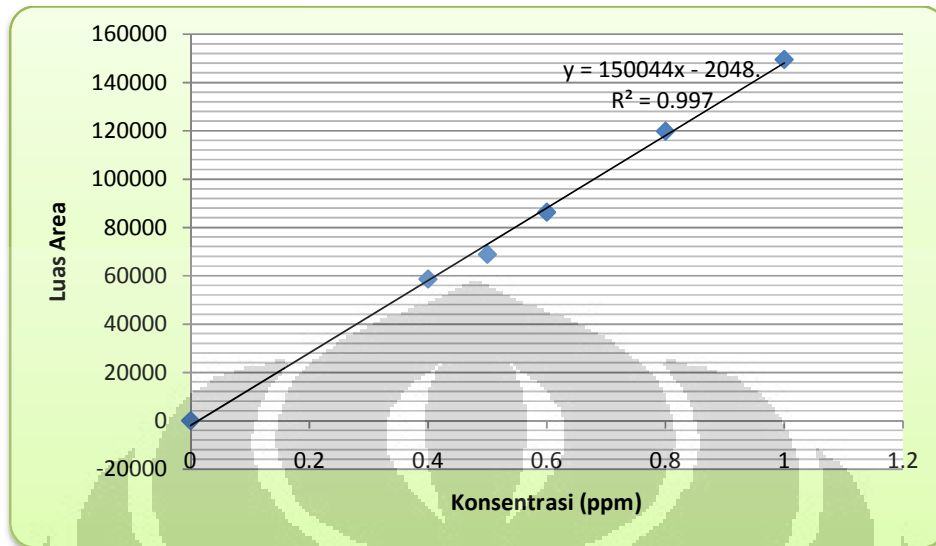
Lampiran 1. Grafik linearitas dengan perlakuan ekstraksi pada larutan standar asam trans, trans-mukonat (a), asam hippurat (b), asam 2-metil hippurat (c), asam 3-metil hippurat (d), dan asam 4-metil hippurat (e).



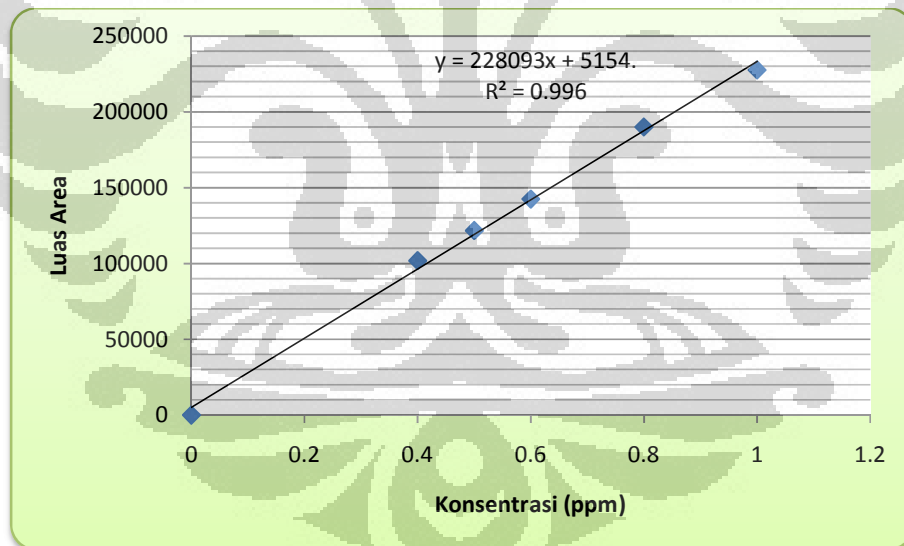
(a)



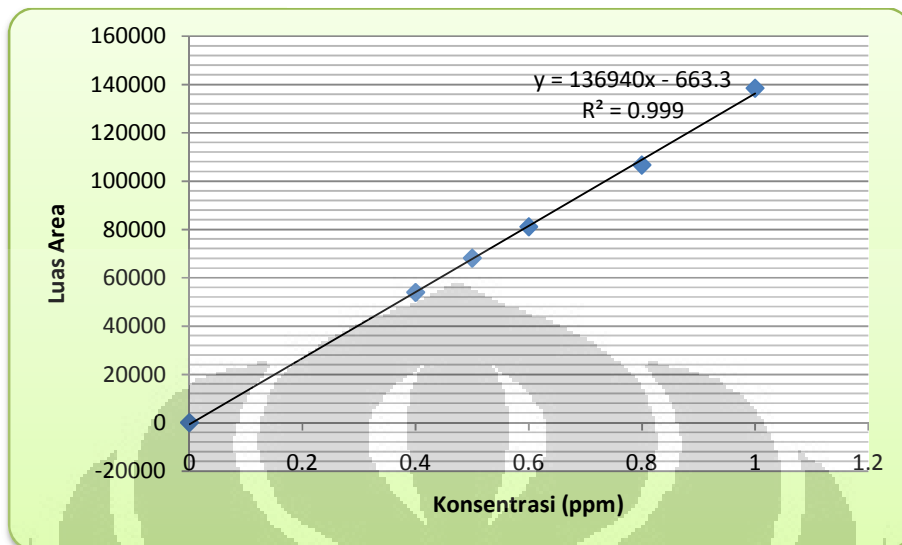
(b)



(c)

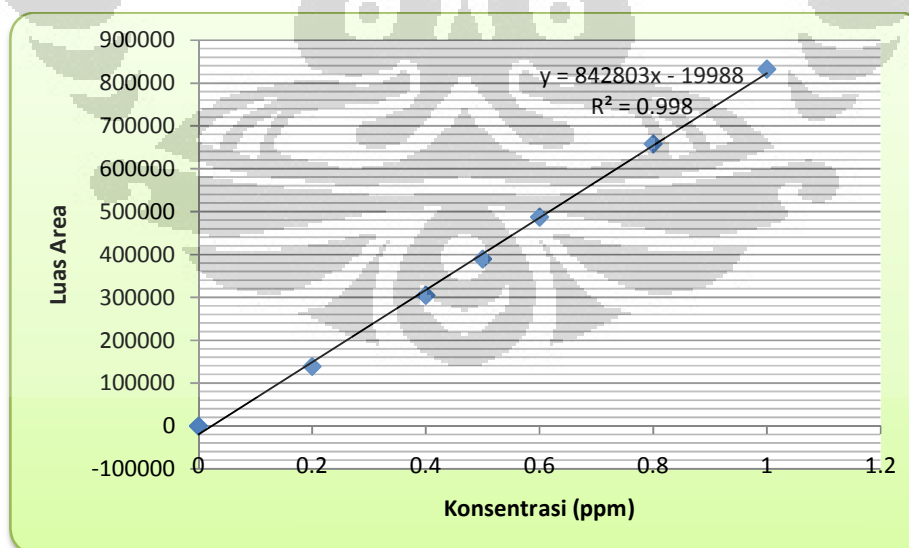


(d)

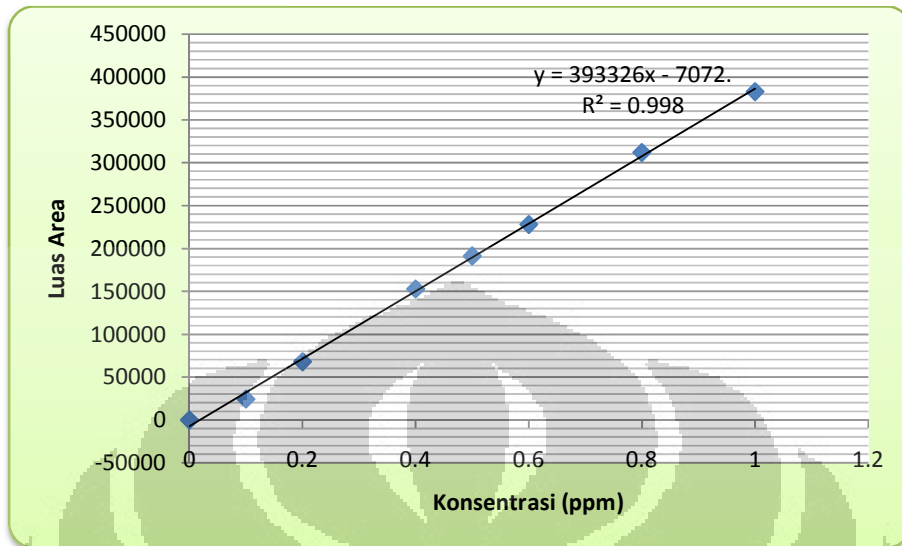


(e)

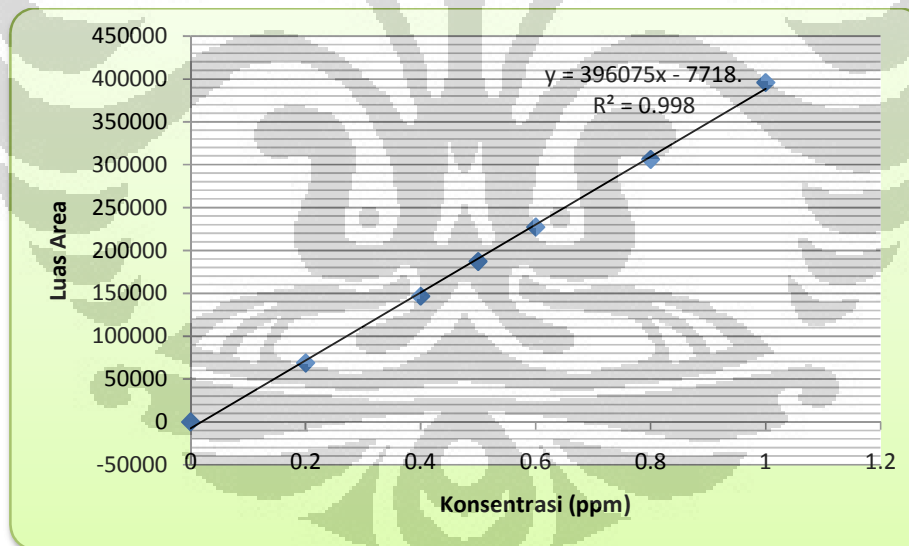
Lampiran 2. Grafik linearitas tanpa perlakuan ekstraksi pada larutan standar asam trans, trans-mukonat (a), asam hippurat (b), asam 2-metil hippurat (c), asam 3-metil hippurat (d), dan asam 4-metil hippurat (e).



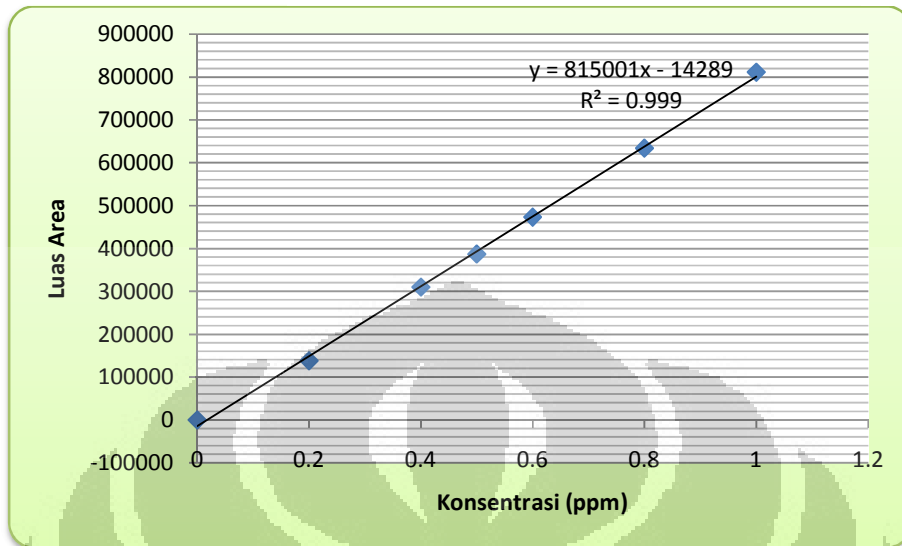
(a)



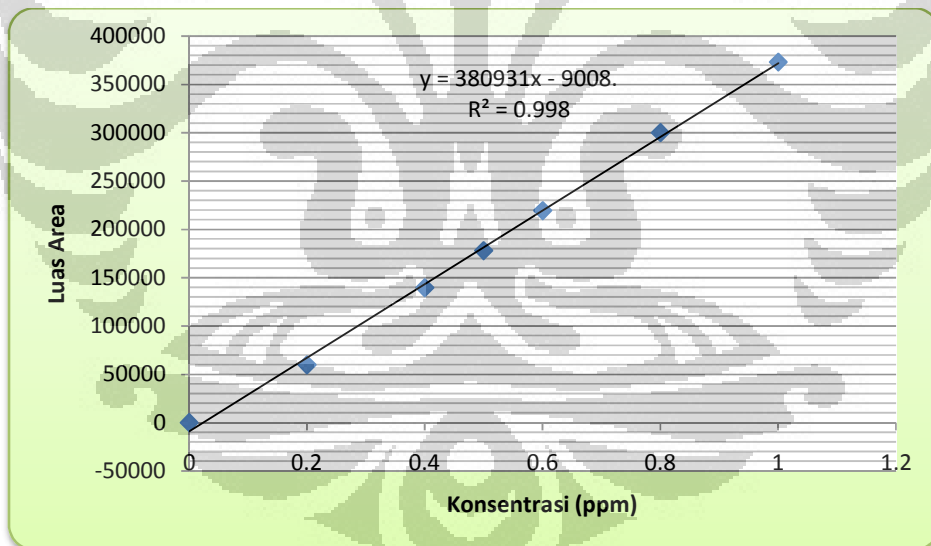
(b)



(c)



(d)



(e)

Lampiran 3. Presisi larutan standar asam trans, trans-mukonat, asam hipurat, asam 2-metil hipurat, asam 3-metil hipurat, asam 4-metil hipurat dengan perlakuan ekstraksi dan tanpa perlakuan ekstraksi

Ekstraksi Asam trans, trans-Mukonat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.4	236695.6	6279.881	2.653
0.5	305952.2	4548.842	1.487
0.6	387157.1	22119.15	5.713
0.8	498931.4	16182.72	3.243
1	638773.3	15271.02	2.391
rata-rata	344584.9	10733.6	2.581

Ekstraksi Asam Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.2	25329.23	432.0709	1.706
0.4	61886.86	949.5435	1.534
0.5	78886.56	688.3843	0.873
0.6	94423.24	886.9954	0.939
0.8	126350.3	3606.677	2.854
1	158480.8	1413.967	0.892
rata-rata	77908.14	1139.663	1.257

Universitas Indonesia

Ekstraksi Asam 2-metil Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.4	58586	2008.758	3.429
0.5	68786.46	949	1.380
0.6	86272.2	2586.508	2.998
0.8	119780.5	1961.158	1.637
1	149433.8	6741.147	4.511
rata-rata	80476.5	2374.429	2.326

Ekstraksi Asam 3-metil Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.4	101804.1	4109.888	4.037
0.5	121690.7	1520.564	1.250
0.6	142481.4	7167.675	5.031
0.8	189998	10850.28	5.711
1	227660	8014.374	3.520
Rata-rata	130605.7	5277.13	3.258

Ekstraksi Asam 4-metil Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.4	53889.86	3102.841	5.758
0.5	68043.23	768.3727	1.129
0.6	81021.43	5022.057	6.198
0.8	106608	4706.715	4.415
1	138360	2946.827	2.130
rata-rata	74653.75	2757.802	3.272

Asam trans, trans-mukonat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.2	138850.2	9377.406	6.754
0.4	304660.3	9524.121	3.126
0.5	389415.7	5563.283	1.429
0.6	487138	13268	2.724
0.8	657736.2	22705.86	3.452
1	832098.1	13563.46	1.630
Rata-rata	401414.1	10571.73	2.731

Asam Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.1	24446	251.7877	1.030
0.2	67917.33	845.0804	1.244
0.4	152790	3631.86	2.377
0.5	191286.7	8282.647	4.330
0.6	228020	4415.299	1.936
0.8	312063.3	3578.23	1.147
1	382872.3	16275.88	4.251
rata-rata	169924.5	4660.098	2.039

Asam 2-metil Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.2	68815.43	768.5933	1.117
0.4	146636.7	440.8899	0.301
0.5	187235.2	529.7444	0.283
0.6	227384.3	503.4295	0.221
0.8	306286.7	7655.818	2.500
1	395872.9	4228.179	1.068
rata-tata	190318.7471	2018.093	0.784

Asam 3-metil Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.2	138010.3	7772.32	5.632
0.4	309880	12928.5	4.172
0.5	386983	9800.782	2.533
0.6	472897.5	8899.747	1.881
0.8	633762	21517.02	3.395
1	810947.5	22135.06	2.729
rata-rata	393211.5	11864.78	2.906

Asam 4-metil Hippurat

Konsentrasi (ppm)	Luas Area		
	Rata-rata	SD	%RSD
0	0	0	0
0.2	59831.67	2641.456	4.415
0.4	139632.9	7357.4	5.269
0.5	178032.5	1850.493	1.039
0.6	219415.4	14072.36	6.414
0.8	300105.3	8213.4	2.737
1	373183.2	6459.287	1.731
rata-rata	181457.3	5799.2	3.086

Keterangan :

SD : Standar deviasi

RSD : Standar deviasi relatif

Universitas Indonesia

Lampiran 4. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) ekstraksi asam trans, trans-mukonat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.3025	0	0	-7356.6	54119566
2	0.4	236695.6	0.16	0.0225	56024792858	94678.23	248600.9	141736289
3	0.5	305952.2	0.25	0.0025	93606748685	152976.1	312590.2	44063627
4	0.6	387157.1	0.36	0.0025	1.49891E+11	232294.3	376579.6	111883237
5	0.8	498931.4	0.64	0.0625	2.48933E+11	399145.1	504558.4	31662571
6	1	638773.3	1	0.2025	4.08031E+11	638773.3	632537.1	38890340
Jumlah	3.3	2067510	2.41	0.595	9.56486E+11	1517867	2067510	422355630
Rata-rata	0.55							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{\quad}{\quad} = 10275.64633 \quad y = 639893x - 7356$$

$$\text{LoD} = \frac{\times}{639893} = \frac{\times 10275.64633}{639893} = 0.048 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{\times}{639893} = \frac{\times 10275.64633}{639893} = 0.161 \text{ ppm}$$

Lampiran 5. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) ekstraksi asam hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.25	0	0	-2663.54	7094434
2	0.2	25329.23	0.04	0.09	6.42E+08	5065.846	29565.13	17942881
3	0.4	61886.86	0.16	0.01	3.83E+09	24754.74	61793.81	8659.127
4	0.5	78886.56	0.25	0	6.22E+09	39443.28	77908.14	957302.9
5	0.6	94423.24	0.36	0.01	8.92E+09	56653.94	94022.48	160610.8
6	0.8	126350.3	0.64	0.09	1.6E+10	101080.3	126251.1	9838.854
7	1	158480.8	1	0.25	2.51E+10	158480.8	158479.8	0.882258
Jumlah	3.5	545357	2.45	0.7	60690950642	385478.8	545357	26173728
Rata-rata	0.5							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \quad = 2287.957 \quad y = 161143x - 2664$$

$$\text{LoD} = \frac{x}{\quad} = \frac{x \cdot 2287.957}{161143} = 0.043 \text{ ppm}$$

$$\text{LoQ} = \frac{x}{\quad} = \frac{x \cdot 2287.957}{161143} = 0.142 \text{ ppm}$$

Lampiran 6. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) ekstraksi asam 2-metil hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.3025	0	0	-2048.21	4195162.598
2	0.4	58586	0.16	0.0225	3.43E+09	23434.4	57969.76	379751.9793
3	0.5	68786.46	0.25	0.0025	4.73E+09	34393.23	72974.25	17537603.15
4	0.6	86272.2	0.36	0.0025	7.44E+09	51763.32	87978.74	2912294.164
5	0.8	119780.5	0.64	0.0625	1.43E+10	95824.42	117987.7	3214134.652
6	1	149433.8	1	0.2025	2.23E+10	149433.8	147996.7	2065216.397
Jumlah	3.3	482859	2.41	0.595	52284624918	354849.2	482859	30304162.94
Rata-rata	0.55							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{30304162.94}{\quad} = 2752.461 \quad y = 150044x - 2048$$

$$\text{LoD} = \frac{\times}{\quad} = \frac{\times 2752.461}{\quad} = 0.055 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{\times}{\quad} = \frac{\times 2752.461}{\quad} = 0.183 \text{ ppm}$$

Lampiran 7. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) ekstraksi asam 3-metil hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.3025	0	0	5154.471	26568575.7
2	0.4	101804.1	0.16	0.0225	10364074777	40721.64	96391.73	29293764.5
3	0.5	121690.7	0.25	0.0025	14808626466	60845.35	119201	6198392.69
4	0.6	142481.4	0.36	0.0025	20300949346	85488.84	142010.4	221881.373
5	0.8	189998	0.64	0.0625	36099240004	151998.4	187629	5612228.69
6	1	227660	1	0.2025	51829075600	227660	233247.6	31221433.4
Jumlah	3.3	783634.2	2.41	0.595	1.33402E+11	566714.23	783634.2	99116276.3
Rata-rata	0.55							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{99116276.3}{\quad} = 4977.857881 \quad y = 228093x + 5154$$

$$\text{LoD} = \frac{\times}{\times} = \frac{\times}{\times} = 0.065 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{\times}{\times} = \frac{\times}{\times} = 0.218 \text{ ppm}$$

Lampiran 8. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) ekstraksi asam 4-metil hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.3025	0	0	-663.368	440056.8
2	0.4	53889.86	0.16	0.0225	2904117011	21555.94	54112.72	49666.72
3	0.5	68043.23	0.25	0.0025	4629881149	34021.62	67806.74	55926.42
4	0.6	81021.43	0.36	0.0025	6564472119	48612.86	81500.76	229761.4
5	0.8	106608	0.64	0.0625	11365265664	85286.4	108888.8	5202087
6	1	138360	1	0.2025	19143489600	138360	136276.9	4339504
Jumlah	3.3	447922.5	2.41	0.595	44607225543	327836.8	447922.5	10317002
Rata-rata	0.55							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{10317002}{\quad} = 1606.005 \quad y = 136940x - 663.3$$

$$\text{LoD} = \frac{\times}{\quad} = \frac{\times 1606.005}{\quad} = 0.035183 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{\times}{\quad} = \frac{\times 606.005}{\quad} = 0.117 \text{ ppm}$$

Lampiran 9. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) asam trans, trans-mukonat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.25	0	0	-19987.8	399510950
2	0.2	138850.2	0.04	0.09	19279389148	27770.05	148573	94531468
3	0.4	304660.3	0.16	0.01	92817916676	121864.1	317133.7	155585180
4	0.5	389415.7	0.25	0	1.51645E+11	194707.9	401414.1	143960368
5	0.6	487138	0.36	0.01	2.37303E+11	292282.8	485694.4	2083841.6
6	0.8	657736.2	0.64	0.09	4.32617E+11	526188.9	654255.2	12117168
7	1	832098.1	1	0.25	6.92387E+11	832098.1	822815.9	86158547
Jumlah	3.5	2809899	2.45	0.7	1.62605E+12	1994912	2809899	893947523
Rata-rata	0.5							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{893947523}{\quad} = 13371.22 \quad y = 842803x - 19988$$

$$\text{LoD} = \frac{x}{\quad} = \frac{x \cdot 13371.22}{842803} = 0.048 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{x}{\quad} = \frac{x \cdot 13371.22}{842803} = 0.159 \text{ ppm}$$

Lampiran 10. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) asam hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.2025	0	0	-7072.5	50020323
2	0.1	24446	0.01	0.1225	597606916	2444.6	32260.15	61060983
3	0.2	67917.33	0.04	0.0625	4612763714	13583.47	71592.81	13509154
4	0.4	152790	0.16	0.0025	23344784100	61116	150258.1	6410390.9
5	0.5	191286.7	0.25	0.0025	36590601597	95643.35	189590.8	2876136.3
6	0.6	228020	0.36	0.0225	51993120400	136812	228923.4	816203.67
7	0.8	312063.3	0.64	0.1225	97383503207	249650.6	307588.8	20021555
8	1	382872.3	1	0.3025	1.46591E+11	382872.3	386254.1	11436366
Jumlah	3.6	1359396	2.46	0.84	3.61114E+11	942122.4	1359396	166151112
Rata-rata	0.45							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{166151112}{\quad} = 5262.305 \quad y = 393326x - 7072$$

$$\text{LoD} = \frac{x}{\quad} = \frac{x5262.305}{393326} = 0.040 \text{ ppm}$$

$$\text{LoQ} = \frac{x}{\quad} = \frac{x262.305}{393326} = 0.134 \text{ ppm}$$

Lampiran 11. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) asam 2-metil hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.25	0	0	-7718.82	59580149
2	0.2	68815.43	0.04	0.09	4735563406	13763.09	71496.21	7186571.5
3	0.4	146636.7	0.16	0.01	21502321787	58654.68	150711.2	16601828
4	0.5	187235.2	0.25	0	35057020119	93617.6	190318.7	9508263
5	0.6	227384.3	0.36	0.01	51703619886	136430.6	229926.3	6461561.4
6	0.8	306286.7	0.64	0.09	93811542597	245029.4	309141.3	8148662
7	1	395872.9	1	0.25	1.56715E+11	395872.9	388356.3	56499093
Jumlah	3.5	1332231	2.45	0.7	3.63525E+11	943368.2	1332231	163986128
Rata-rata	0.5							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{163986128}{\quad} = 5726.886 \quad y = 396075x - 7718$$

$$\text{LoD} = \frac{\times}{396075} = \frac{\times 5726.886}{396075} = 0.043 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{\times}{396075} = \frac{\times 5726.886}{396075} = 0.145 \text{ ppm}$$

Lampiran 12. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) asam 3-metil hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.25	0	0	-14289.3	204183176
2	0.2	138010.3	0.04	0.09	19046829105	27602.05	148711	114506586
3	0.4	309880	0.16	0.01	96025614400	123952	311711.3	3353725.09
4	0.5	386983	0.25	0	1.49756E+11	193491.5	393211.5	38793767.4
5	0.6	472897.5	0.36	0.01	2.23632E+11	283738.5	474711.6	3290997.68
6	0.8	633762	0.64	0.09	4.01654E+11	507009.6	637711.9	15601738.2
7	1	810947.5	1	0.25	6.57636E+11	810947.5	800712.2	104761439
Jumlah	3.5	2752480	2.45	0.7	1.54775E+12	1946741	2752480	484491429
Rata-rata	0.5							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{484491429}{\quad} = 9843.693 \quad y = 815001x - 14289$$

$$\text{LoD} = \frac{x}{815001} = \frac{x \cdot 9843.693}{815001} = 0.036 \text{ ppm}$$

$$\text{LoQ} = \frac{x}{815001} = \frac{x \cdot 9843.693}{815001} = 0.121 \text{ ppm}$$

Lampiran 13. Limit deteksi (LoD) dan limit kuantisasi (LoQ) asam 4-metil hippurat

				(-)				(-)
1	0	0	0	0.25	0	0	-9008.39	81151154.7
2	0.2	59831.67	0.04	0.09	3579828735	11966.33	67177.88	53966832.8
3	0.4	139632.9	0.16	0.01	19497346762	55853.16	143364.2	13922285.2
4	0.5	178032.5	0.25	0	31695578178	89016.26	181457.3	11729088.7
5	0.6	219415.4	0.36	0.01	48143130922	131649.3	219550.4	18225.9643
6	0.8	300105.3	0.64	0.09	90063197090	240084.2	295736.7	19084672.2
7	1	373183.2	1	0.25	1.39266E+11	373183.2	371923	1588242.67
Jumlah	3.5	1270201	2.45	0.7	3.32245E+11	901752.5	1270201	181460502
Rata-rata	0.5							

$$\text{Standar Deviasi (SD)} = \frac{\sum(\quad)}{\quad} = \frac{181460502}{\quad} = 6024.293 \quad y = 380931x - 9008.$$

$$\text{LoD} = \frac{\times}{380931} = \frac{\times 6024.293}{380931} = 0.047 \text{ ppm} \quad \text{LoQ} = \frac{\times}{380931} = \frac{\times 6024.293}{380931} = 0.158 \text{ ppm}$$

Lampiran 14. Analiss Kuantitatif tt-MA, HA, 2-MHA, 3-MHA, 4-MHA pada urin

Sampel	Luas Area					Kadar (mg/L)				
	ttMA	HA	2-MHA	3-MHA	4-MHA	ttMA	HA	2-MHA	3-MHA	4-MHA
1	23310	1356300				0.047924	8.433277			
2		2065000	2088700	1121900	919090		12.83123	13.93414	4.89601	6.71647
3		7443300	66957	242250	169310		46.20718	0.459897	1.039469	1.241225
4	238950	3859800				0.384917	23.96917			
5	154570	162410				0.253051	1.024392			
6	166910	6788400	33845	102420	70713	0.272336	42.14309	0.239216	0.426429	0.521224
7		5566300	29449	90469	60942		34.55914	0.209918	0.374034	0.449871

Lampiran 15 Recovery Sampel

Sampel	Luas Area					Kadar (mg/L)				
	tt-MA	HA	2-MHA	3-MHA	4-MHA	tt-MA	HA	2-MHA	3-MHA	4-MHA
1	589730	1430900	129130	181940	110017	0.933101	8.89622	0.874259	0.775059	0.80824
2	535000	2159500	2132900	1209870	946710	0.847572	13.41767	14.22872	5.281686	6.918164
3	570100	7586000	180940	410510	273970	0.902424	47.09273	1.219555	1.77715	2.005502
4	756780	3895610	125294	192616	122796	1.19416	24.19139	0.848693	0.821864	0.901558
5	686070	283405	129437	197950	122222	1.083658	1.775247	0.876305	0.84525	0.897367
6	722560	6835900	160636	289600	175730	1.140683	42.43786	1.084236	1.247059	1.288107
7	570750	5695800	153923	293790	182800	0.90344	35.36277	1.039496	1.265429	1.339736