



JURNAL KIMIA MULAWARMAN

Studi Kandungan Kimia Dan Bioaktivitas Ekstrak Etanol Kulit Batang *Alstonia Iwahigensis*

Eva Marliana dan Sjarif Ismail (1-4)

Uji Kemampuan *Bacillus megaterium* Menyerap Logam Berat Merkuri

Muhammad Badjoeri (5-11)

Adsorpsi Tembaga (Cu) Oleh Arang Aktif Dari Tempurung Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.)

Teguh Wirawan (12-15)

Pengaruh Penambahan Starter *Acetobacter aceti* Dan Lama Asetifikasi Terhadap Kadar Asam Asetat Pada Cuka Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.)

Rudi Kariika (16-21)

Perbandingan Metode Pengadukan, Sonikasi Dan Gelombang-Mikro Dalam Ekstraksi Spesies Arsenik Dalam Tanaman

Bohari (22-29)

Analisis Kadar Klorida, pH dan Kesadahan Total Pada Air Sumur Bor Di Pesisir Balikpapan Akibat Intrusi Air Laut

Soerja Koesnarpadi dan Dewi Muchayanah (30-34)

Sintesis Metil Ester Dari Minyak Jelantah Dengan Cara Interesterifikasi Dan Pengaruh Lama Esterifikasinya Terhadap Kadar Asam Lemak Bebas

Ritson Purba (35-40)

Aplikasi Teknik Adisi Standar Pada Penetapan Kadar Besi (III) Dalam Air Sungai Karang Mumus Dengan Spectronic 21-D

Maasje Catherine Watulingas (41-45)

Perbandingan Kapasitas Adsorpsi Gambut Terhadap Logam Tembaga Dan Timbal Pada Sistem Aliran Normal

Alimuddin (46-48)

**KIMIA FMIPA
UNIVERSITAS MULAWARMAN**

Pembina:

Prof. Dr. Ir. H. Achmad Ariffien Bratawinata, M.Agr.
(Rektor Universitas Mulawarman)

Drs. Sudrajat, SU
(Dekan FMIPA Universitas Mulawarman)

Editor Ahli:

Prof. Dr. Maria Bintang (IPB), Prof. Dr. Hardjono Sastrohamidjojo (UGM),

Prof. Dr. H. R. Brahmana. M.Sc. (USU), , Dr.Ir. Prastawa Budi (Unhas),

Prof. Dr. Ir. H. Achmad Ariffien Bratawinata, M.Agr. (Unmul),

Prof. Dr. Ir. H. Bandi Suprptono, M.Agr (Unmul)

Prof. Dr. Sipon Muladi (Unmul), Dr. Bohari, M.Si (Unmul),

Dr. Saibun Sitorus, M.Si (Unmul), Dr. Asfie Maldi, M.Sc (Unmul),

Ir. Edi Sukaton, M.Sc (Unmul),

Dra. Gracia Susan Arfan, Apt., M.Si (BPOM Kaltim)

Editor Pelaksana:

Alimuddin, Rudi Kartika, Aman S Panggabean, Rahmat Gunawan, Erwin,
Ahmad Fatoni

Administrasi:

Subur P Pasaribu, Teguh Wirawan, Daniel, Chairul Saleh,
Deasy Liestianty, Usman

Keuangan:

Winni Astuti, Eva Marlina, Soerja Koesnarpadi, Halimahtussadiyah

Distributor:

Ritson Purba, Abdul Aziz, Abdul Kahar, Diah Kusmardini

Alamat Redaksi:

Kampus Unmul Gunung Kelua

Jl. Barong Tongkok No. 4

Tel (0541)749152 Pesawat 104 Fax (0541)749140 Samarinda 75123

e-mail: jkm-unmul@yahoo.com

Rekening: Bank Muamalat an: Kimia FMIPA Unmul

No. rek.:905.2266599

ISSN 1693-5616



9 771693 561604

PERBANDINGAN METODA PENGADUKAN, SONIKASI DAN GELOMBANG-MIKRO DALAM EKSTRAKSI SPESIES ARSENİK DALAM TANAMAN

COMPARISON OF EXTRACTION METHODS (AGITATION, SONICATION AND MICRO-WAVE) OF ARSENIC SPECIES IN PLANTS MATERIALS

Bohari

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman
Jl. Barong Tongkok No. 4 Tel: +62541749152 Fax: +62541749140
Kampus Gn. Kelua Samarinda 75123

Abstract

A Comparison of Extraction Methods (Agitation, Sonication and Micro-Wave Extraction) of arsenic species in plant materials has been studied. The aim of this research is to search the best method where can be used in extraction of arsenic species especially in plants materials. The extraction solvents (water, metahol-water mixtures, and ortho phosphoric acid) are also investigated. For compare the extraction methods, we used three different apparatus: shaking bath, ultrasonic instrument and Open Microwave Oven. The analytical method used was Hyphenated Technique HPLC-HG-AFS with optimum condition. The plant materials sample used were Certified Reference Materials (CRMs) Virginia Tobacco (CRM CTA-VTL2), peach leaves (CRM GBW-08501) and sea lettuce (CRM BCR 279). The Results of this research show that extraction method using micro-wave was the best method for all type of solvent. Ortho phosphoric acid was the best solvent that yields arsenic species extracts until 67%.

Keywords: *Extraction, Arsenic, Micro-wave, Sonication, Agitation.*

A. PENDAHULUAN

Penelitian-penelitian tentang spesiasi arsenik yang terdapat di dalam material biologi telah banyak dilakukan, akan tetapi sebagian besar penelitian dilakukan terhadap **organisme laut** seperti *alga* [McSheehy dan Szpunar, 2000; Feldmann dkk. 2000; Gómez-Ariza dkk. 2000], *tanaman laut* [Cai dkk., 2000] dan terutama binatang laut seperti : *kerang hijau* [Dagnac dkk., 1999; Lagarde dkk., 1999c], *ikan* [Campbell dkk., 1999, McKiernan dkk., 1999], *gastropoda* [Goessler dkk., 1997], *udang* [Hunter dkk., 1998], dan *kerang-kerangan* [Lai dkk., 1999]. Spesiasi arsenik dalam organisme laut adalah sesuatu hal yang khusus sebab bentuk-bentuk arsenik yang umum ditemukan adalah arsenobetain, arsenokholin dan gula-gula arsenik.

Penelitian yang berhubungan dengan **organismes darat**, Jamur adalah sampel yang paling banyak diteliti. Jamur merupakan akumulator arsenik yang sangat penting, dan seperti organisme laut, jamur dapat me-metabilisame unsur arsenik. Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa jamur yang ditumbuhkan di atas tanah yang terkontaminasi oleh arsenik pentoksida atau senyawa arsenik lainnya yang merupakan hasil pengolahan mineral, mengandung sejumlah besar spesies yang berbeda seperti : As(III), As(V), MMAA, DMAA, arsenobetain, arsenokholin,

kation tetra-metilarsonium dan gula arsenik [Koch dkk., 2000; Becerio-González dkk., 2000].

Masih sangat sedikit penelitian yang telah dilakukan terhadap spesiasi arsenik dalam tanaman darat. Beberapa studi yang dapat dikemukakan adalah spesiasi arsenik dalam tanaman *padi* (*Oryza sativa*) [Marin dkk., 1993], *Holcus lanatus* [Schmidt dkk., 2000], *tomat* [Burló dkk., 1999], *wortel* [Helgesen dan Larsen, 1998], *kacang buncis* [Mattuch dkk., 2000], *appel* [Caruso dkk., 2001] dan tanaman hijau lainnya serta *lichens* [Kuehnelt dkk, 2000, Bohari dkk, 2002].

Konsentrasi arsenik yang dapat dideteksi dalam tanaman dan sayur-sayuran pada umumnya lebih rendah dibanding kandungan arsenik dalam organisme laut. Tanaman darat yang tak terkontaminasi mengandung sekitar 0,2 hingga 0,4 mg(As).kg⁻¹ [Kuehnelt dkk., 2000]. Meskipun demikian beberapa tanaman yang telah diteliti mampu mentolerir kandungan arsenik konsentrasi tinggi, sebagai contoh *Agrostis tenuis*, *Agrostis stolonifera* (dapat mengakumulasi hingga 1% berat) [Benson dkk., 1981], *Cynodon dactylon* (180 mg(As).kg⁻¹) [Hill, 1983], *Equisetum pratense* (8,45 mg(As).kg⁻¹) [Kuehnelt dkk., 2000], atau beberapa alga seperti *Cassinia laevis* (27 mg(As).kg⁻¹) dan *Calotis lappulacea* (23 mg(As).kg⁻¹) [Ashley dan Lottermoser, 1999].

Variasi riset tentang spesiasi tersebut juga memberikan variasi metoda ekstraksi yang berbeda. Belum ditemukan adanya riset khusus yang meneliti tentang perbandingan metoda ekstraksi untuk spesiasi arsenik dalam bahan tanaman. Oleh karena itu peneliti sangat tertarik untuk melakukan perbandingan metode ekstraksi yang umum digunakan, khususnya metoda pengadukan, sonikasi dan penggunaan gelombang mikro.

Tujuan penelitian ini adalah menemukan dan mengembangkan metoda ekstraksi pada spesiasi arsenik dengan HPLC-HG-AFS dalam tanaman, kemudian berusaha menemukan metoda ekstraksi terbaik untuk arsenik dalam tanaman dengan menggunakan material referensi yang bersertifikat terhadap kandungan arsenik totalnya : yaitu daun tembakau Virginia (CRM CTA-VTL2). Efektifitas metoda juga telah diverifikasi terhadap dua material referensi lainnya yaitu : peach leaves (CRM GBW-08501) dan sea lettuce (CRM BCR 279). Untuk optimisasi metoda ekstraksi, pengaruh beberapa parameter telah dipelajari yaitu : prosedur ekstraksi dan komposisi ekstraktan.

B. METODE PENELITIAN

Larutan Standard dan Reagen

Semua reagen yang digunakan adalah kualitas *analytical-reagent grade* kecuali untuk asam Posfat, asam nitrat dan hydrogen peroksida yang mempunyai kualitas *Merck suprapur*. Sebanyak 1000 mg.l⁻¹ stok larutan standard dibuat dengan melarutkan NaAsO₂ (Merck), NaHAsO₄.7H₂O (Prolabo), (CH₃)₂AsO₂.Na.3H₂O (Stream Chemicals) and CH₃AsO(ONa)₂. 6H₂O (Carlo Erba) dalam air kualitas milli-Q (18 MΩ, 2-4 ppb of COT, Millipore, Bedford, MA, USA) dan disimpan pada suhu 4°C dalam keadaan gelap. Larutan standar As(III) dijaga hingga hanya satu bulan untuk mencegah transformasi ke spesies As(V). Sedangkan larutan standar spesies lainnya dapat disimpan hingga beberapa bulan. Larutan standar intermediat (10 mg.l⁻¹) disiapkan setiap hari dan digunakan langsung pada saat akan digunakan. Larutan juga selalu diuji setiap hari dalam hubungannya dengan kontrol kualitas peralatan.

Larutan Buffer Posfat digunakan sebagai fase mobil HPLC yang dibuat dari NH₄H₂PO₄ dan (NH₄)₂HPO₄ (Merck), pH ditetapkan dengan menambahkan larutan NH₃ (Merck). Fase gerak kromatografi selalu disaring secara kontinyu

dengan filter membrane 0,45 μm. Larutan NaBH₄ 2,5 % (m/v) (Fluka) distabilkan dengan 1% (m/v) NaOH (Merck) dan disiapkan langsung pada saat akan digunakan. HCl diperoleh dari Merck and methanol diperoleh dari bahan kimia produksi Prolabo.

Untuk bahan uji digunakan material referensi yang bersertifikat terhadap kandungan arsenik totalnya yaitu daun tembakau Virginia (CRM CTA-VTL2). Kemudian diverifikasi terhadap dua material referensi lainnya yaitu : peach leaves (CRM GBW-08501) dan sea lettuce (CRM BCR 279). Semua peralatan sebelumnya didekontaminasi dengan merendam dalam larutan HNO₃ 10% selama beberapa hari, kemudian dibilas dengan air sebelum digunakan.

Peralatan

Peralatan yang digunakan dan kondisi operasionalnya disajikan dalam table 1 [Bohari dkk, 2001 dan 2007]. Sistem HPLC yang digunakan adalah Varian 5000 dengan mode gradien. Injeksi sampel menggunakan injector (Rheodyne, CA, USA) dengan volume injeksi 100 μl (Interchim). Kolom kromatografi yang digunakan adalah kolom penukar anion Hamilton PRP X-100 (25 cm x 4 mm id). Pada ujung kolom disambungkan dengan Sistem Pembangkit model ES 120S (Spectra France, Pau, France). Untuk memompa larutan HCl dan NaBH₄ digunakan pompa peristaltik.

Sebagai detector digunakan The Excalibur Atomic Fluorescence Detector (PS Analytical, UK) yang dilengkapi dengan lampu katoda berongga (Photron) dan output signal kromatogram dicatat dengan menggunakan Borwin chromatographic software (JMBS, Grenoble, France). Desain peralatan AFS Excalibur sudah dimodifikasi dari aslinya dengan introduksi langsung gas argon-hydrogen ke dalam nyala dengan tujuan untuk menstabilkan nyala dan memuluskan *base-line* signal yang dihasilkan. Untuk pembakaran disuplai dari kelebihan hydrogen yang dihasilkan selama proses reaksi hidratisasi.

Peralatan yang akan dibandingkan adalah rotated shaker (KS 250 Basic IKA Labortechnik), Ultrasonic instrument (Branson 1210, Danbury, CT, USA) dan Open Microwave Oven (Prolabo Microdigest 301). Supernatan dipisahkan dengan sentrifugasi menggunakan model Hettich Universal 16 (Tuttlingen, Germany). Rotavapor juga digunakan untuk mengeliminasi methanol yaitu model Heidolph VV Mikro (Germany).

Tabel 1 : Kondisi Optimum untuk pemisahan spesies arsenic dengan HPLC

HPLC	
Kolom	: Hamilton PRP-X100 9250 mm x 4,1 mm i.d. ukuran partikel 10 µm
Fase Gerak	: Lar. A : Amonium Fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 5 mmol^{-1} pH 4,8 Lar. B : Amonium Fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) 30 mmol^{-1} pH 8,0
Volume Injeksi	: 100 µL
Laju alir	: 1 ml menit ⁻¹
Mode Gradien	: 0 s/d 4,1 menit : Larutan A Mode Isokratik : Larutan B 4,1 s/d 10,1 menit : Larutan B 10,1 s/d 20,0 menit : Larutan A
HG-AFS	
Larutan Asam	: 3,0 mol L ⁻¹ ; 0,35 ml.menit ⁻¹
Pereduksi	: 2,5% (b/v) NaBH ₄ dalam 1% NaOH ; 1,0 ml.menit ⁻¹
Laju alir Ar primer	: 100 ml.menit ⁻¹
Laju alir Ar sekunder	: 300 ml.menit ⁻¹
Laju alir hydrogen	: 30 ml.menit ⁻¹
Arus Primer	: 27,5 mA
Arus penguat	: 35,0 mA

Prosedur

a. Ekstraksi dengan pengkocokan/pengadukan dan atau sonikasi

Prosedur yang digunakan adalah sebagai berikut : sekitar 0,2 g material solid dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi bersama dengan 10 ml larutan ekstrak dan kemudian diaduk/dikocok selama 14 jam [Kuehnelt dkk., 2000; Chatterjee, 2000a dan Goessler dkk., 1998] pada temperatur kamar pada suatu shaker rotatif. Untuk sonikasi, larutan tersebut dimasukkan ke dalam ultrasonic bath selama 30 atau 60 minutes [Slejkovec dkk., 1999].

Campuran "ekstrak ditambah residu" kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan putaran 3500 rpm. Supernatan selanjutnya dilarutkan dalam labu 25 ml dan disaring dengan filter 0,2 µm sebelum diinjeksikan ke kolom kromatografi. Pada saat metanol digunakan sebagai ekstrak, terlebih dahulu metanol tersebut dihilangkan dengan menggunakan evaporator pada suhu 40°C dalam suasana vakum untuk menghindari interferensi metanol terhadap pemisahan kromatografi. Volume larutan kemudian dipaskan hingga 25 ml.

b. Kombinasi pengadukan-sonikasi

Suatu kombinasi dari dua prosedur ekstraksi juga dicoba yaitu : pengadukan selama 4 jam dari 0,3 g sampel dalam 10 ml ekstrak kemudian diikuti dengan sonikasi selama 1 jam.

c. Ekstraksi dengan microwave

sekitar 0,5 g material solid dimasukkan ke dalam tabung ekstraksi dengan 25 ml ekstrak kemudian dipanasi suatu radiasi microwave dengan kekuatan 40 Watt selama 20 menit [Thomas

dkk., 1997] atau 50 Watts selama 6 menit. Setelah didinginkan, campuran ekstrak dan residu di transfer secara kuantitatif ke dalam sebuah tabung centrifuge sebelum di olah lebih lanjut seperti pada prosedur sebelumnya yaitu centrifuge 3500 rpm selama 15 minutes, pelarutan dalam labu 50 ml dan filtrasi dengan filter 0,2 µm sebelum dianalisis.

d. Mineralisasi ekstrak dan residu

Sebelum perhitungan dilakukan, setiap residu ekstraksi dan juga 10 ml ekstrak yang berhubungan dimineralisasi dengan menggunakan microwave dan campuran asam nitrat suprapur (65% w/w) dan hidrogen peroksida (30 % w/w) [Damkröger dkk., 1997; Mattusch dkk., 2000]. Cai dkk., (2000) telah mengisyaratkan bahwa penggunaan medium $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ untuk mineralisasi tanaman dapat menghindari penguapan arsenik. Program microwave yang digunakan adalah (Watt/min.) : 30W/4 ; 50W / 4 ; 70W / 4. Larutan-larutan yang diperoleh kemudian ditransfer ke dalam labu 10 atau 25 ml sebelum dianalisis. Konsentrasi arsenik total dalam larutan tersebut ditentukan dengan menggunakan metode HG-AFS dan untuk beberapa sampel, hasilnya dibandingkan dengan penentuan melalui spektrometri ICP-MS.

C. HASIL DAN PEMBAHASAN

a) Ekstraksi dengan Air

Pertama-tama digunakan air sebagai ekstrak (Tabel 2). Dalam ekstrak material referensi yang dipelajari, hanya mendeteksi keberadaan arsenik anorganik yang pada umumnya adalah arsenat. Tergantung pada prosedur yang digunakan, rendemen yang diperoleh antara 13% hingga 35 %. Dengan menggunakan ekstrak ini yang menunjukkan bahwa hasil ini kurang memuaskan.

Tabel 2 : Prosentase ekstraksi (pelarut air) spesies arsenik yang ditemukan dalam CRM VTL-2 (Daun Tembakau) yang mengandung arsenik total $949 \mu\text{g}(\text{As}).\text{kg}^{-1}$

Metoda Ekstraksi	(% dibandingkan dengan kandungan total tersertifikasi)		
	As(III)	As(V)	As Total
Pengadukan (14 jam)	1	17	18
Sonikasi (30 menit)	1	12	13
Sonikasi (60 menit)	1	16	17
Pengadukan (4 jam) + Sonikasi (30 menit)	2	24	26
Gelombang Mikro (50 Watt, 6 menit)	7	27	34
Gelombang Mikro (40 Watt, 20 menit)	8	27	35

Radiasi microwave memberikan hasil terbaik. Tidak ada perbedaan signifikan antara pengadukan/pengocokan dengan sonikasi. Kombinasi pengadukan dan sonikasi dapat memperbaiki efektifitas ekstraksi dari 17 hingga 26 %. Perpanjangan waktu radiasi tidak memberikan perbaikan yang berarti.

Suatu studi perbandingan antara ekstraksi dengan pengadukan dengan ekstraksi cair tekanan tinggi (PLE : *Pressurized liquid extraction*) untuk spesies arsenik dalam tanaman (*Holcuss lanatus*) telah dilakukan oleh Darland dan Inskeep (1997). Hasil yang mereka peroleh menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh dengan PLE tiga kali lebih besar dibandingkan pengadukan. Dari perbandingan ini, suatu ekstraksi yang dilakukan dengan air melalui sonikasi kelihatannya cukup efektif untuk ekstraksi arsenik dalam udang [Hunter et al, 1998] dan sangat baik untuk ikan (DORM-2) dengan pengadukan [Londesborough dkk., 1999].

b) Campuran air-metanol

Ekstraksi-ekstraksi yang menggunakan campuran air-metanol sudah sangat umum digunakan untuk mengekstrak spesies-spesies arsenik sampel-sampel biologi, seperti dala jamur [Koch dkk., 2000], tanaman [Schmidt dkk., 2000; Caruso dkk., 2001] dan khususnya sampel-sampel dari laut [McKiernan dkk., 1999; Gomez-Ariza dkk., 2000b; Hanoaka dkk., 2001].

Pertama-tama diuji efektifitas campuran air-metanol dalam berbagai perbandingan : dari 10 hingga 90% MeOH dengan menggunakan

pengadukan. Kemudian dipilih tiga dari campuran ini untuk mengevaluasi efek dari sonikasi dan yang terbaik dari ketiganya digunakan untuk mengevaluasi efektifitas kombinasi pengadukan + sonikasi dan radiasi microwave. Hasil-hasil yang diperoleh dari studi ini dipresentasikan dalam tabel 3. Rendemen ekstraksi yang diperoleh pada umumnya rendah, khususnya jika menggunakan metoda pengadukan (4 - 16 %) atau sonikasi (1 - 11 %), terbaik untuk microwave (31 %). Dalam literatur, rendemen ekstraksi yang diperoleh dengan menggunakan campuran air-metanol bervariasi tergantung metoda yang digunakan dan tipe sampel [Gomez-Ariza dkk., 2000b]. Metoda sonikasi [McKiernan dkk., 1999; McSheehy dan Szpunar, 2000] dan microwave [Ackley dkk., 1999; Lagarde dkk., 1999] lebih banyak diaplikasikan terhadap organisme laut, sementara metoda pengadukan kelihatannya sangat baik untuk jamur [Slejkovec dkk., 1997a]. Dalam sampel-sampel yang dimaksud di atas, spesies-spesies arsenik kationik adalah yang paling banyak ditemukan. Hal ini tidak kami jumpai dalam sampel yang kami pelajari dimana tidak ada perbedaan signifikan jika menggunakan pengadukan atau kombinasi pengadukan (4h)/sonikasi (1h).

Dapat dikatakan bahwa dalam matriks ini, ekstraksi dengan menggunakan air umumnya lebih efektif dibanding ekstraksi dengan menggunakan campuran air-metanol. Sebuah observasi serupa telah dilakukan dalam analisis semut (*formica sp.*) [Kuehnelt dkk., 1997b] dan beberapa tanaman [Kuehnelt dkk., 2000].

Tabel 3 : Prosentase ekstraksi (pelarut campuran air-metanol) spesies arsenik yang ditemukan dalam CRM VTL-2 (Daun Tembakau) yang mengandung arsenik total $949 \mu\text{g}(\text{As}).\text{kg}^{-1}$

Metoda Ekstraksi	(% dibandingkan dengan kandungan total tersertifikasi)		
	As(III)	As(V)	As Total
Pengadukan	2	14	16
- 10 % MeOH	1	14	15
- 20 % MeOH	1	10	11
- 30 % MeOH	1	8	9
- 40 % MeOH	1	8	9
- 50 % MeOH	1	8	9
- 60 % MeOH	1	8	9
- 70 % MeOH	1	6	7
- 80 % MeOH	1	3	4
- 90 % MeOH			
Sonikasi (30 menit)	1	10	11
- 10 % MeOH	<LD	4	4
- 50 % MeOH	nd	1	1
- 90 % MeOH	2	13	15
Pengadukan (4 jam) + Sonikasi (1 jam); 10% MeOH	6	25	31
Gelombang Mikro (10% MeOH, 50 Watt, 6 menit)			

Menurut Muñoz et al (1999), ekstraksi arsenik anorganik dengan menggunakan pelarut organik kurang efektif, khususnya untuk bentuk arsenit, karena pelarut tidak mampu memecah ikatan antara As(III)-group thiol dari protein salam sampel.

Ekstraksi berkesinambungan : Tiga ekstraksi berkesinambungan dengan menggunakan campuran yang mengandung 10% metanol telah

juga dilakukan terhadap daun tembakau dengan menggunakan prosedur pengadukan (Tabel 4). Rendemen global dari ekstraksi ini meningkat dari 16 à 25 % tetapi hasilnya pun masih dibawah hasil yang ditemukan jika menggunakan sekali ekstraksi dengan microwave yang memberi keuntungan dan waktu yang tak dapat dibandingkan.

Tabel 4 : Ekstraksi berkesinambungan terhadap CRM-CTA VTL-2 (pengadukan 14 jam, MeOH 10%)

	(% dibandingkan dengan kandungan total tersertifikasi)		
	As(III)	As(V)	As Total
Ekstraksi pertama	2	14	6
Ekstraksi Kedua	<LD	6	6
Ekstraksi Ketiga	<LD	4	4

Pengaruh perbandingan massa-volume :

Dalam kondisi yang sama dengan sebelumnya, dipelajari pula pengaruh perbandingan massa sampel terhadap volume larutan ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa mulai dari 0,3 gram untuk 10 ml, rendemen arsenik menurun, kelihatannya karena alasan kesulitan melarutkan sampel yang ter-liofilisasi. Untuk selanjutnya ditetapkan proporsi 0,2 g sampel dalam 10 ml ekstrak untuk penelitian selanjutnya termasuk aplikasi terhadap sampel alamiah.

c) Asama Fosfat

Asam fosfat adalah suatu ekstrak yang sangat sering digunakan untuk mengekstrak berbagai spesies arsenik dari dalam tanah atau sedimen [Demessmay, 1992; Amran dkk, 1995; Demessmay et Ollé, 1997; Thomas dkk, 1997;

Vergara, 1999; Montperrus, 2000]. Sebaliknya, belum pernah ditemukan publikasi ilmiah tentang penggunaan asam fosfat untuk ekstraksi arsenik dari material biologi.

Studi tentang penggunaan asam fosfat $0,3 \text{ mol.l}^{-1}$ dilakukan dengan menggunakan prosedur sonikasi atau radiasi microwave, setelah penelitian sebelumnya menunjukkan ketidak efektifan metoda pengadukan. Rendemen-rendemen yang ditemukan dengan menggunakan ekstrak ini seluruhnya menunjukkan hasil yang lebih baik dengan studi sebelumnya. (Tabel III.11). Hanya bentuk-bentuk arsenik inorganik yang dapat diperlihatkan dengan spesies mayoritas As(V). Ekstraksi menggunakan microwave sejauh ini yang paling efektif, meskipun rendemen yang diperoleh masih cukup jauh dari yang diharapkan.

Tabel 5 : Hasil ekstraksi arsenik pada daun tembakau menggunakan Asam Fosfat dengan metoda ekstraksi berbeda

	(% dibandingkan dengan kandungan total tersertifikasi)		
	As(III)	As(V)	As Total
Sonikasi (30 menit)	2	36	38
Sonikasi (60 menit)	3	37	40
Gelombang Mikro (40 W, 20 men)	11	56	67

Prosedur yang menggunakan asam fosfat ini kelihatannya menjanjikan, stabilitas dari As(III) dan As(V) selama prosedur dijalankan juga telah diuji. As(III) atau As(V) ditambahkan dalam sampel daun tembakau sebelum diekstraksi dengan asam fosfat ($0,3 \text{ mol.l}^{-1}$) dengan menggunakan microwave. Setelah analisis, 95% As(III) dan 102% As(V) yang telah ditambahkan berhasil diperoleh kembali, hal ini memungkinkan untuk memberikan kesimpulan bahwa As(III) dan As(V) keduanya stabil dalam matriks ini selama proses ekstraksi. Suatu penelitian tentang stabilitas spesies-spesies arsenik mineral atau termetilasi selama proses ekstraksi dengan asam fosfat telah dilakukan terhadap larutan standar dan juga terhadap tanah, sedimen dan lumpur (sewage sludge) [Vergara-Gallardo dkk, 2001] dengan kesimpulan yang sejalan. Stabilitas ini dalam media tersebut telah

diselidiki juga oleh Thomas et al (1997) dan Demesmay dan Ollé (1997).

D. KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa untuk ekstraksi spesies arsenic dari bahan tanaman, maka metoda ekstraksi menggunakan gelombang mikro dengan kondisi 40 Watt selama 20 menit adalah metoda yang paling efektif, tergantung pelarut yang digunakan. Sedangkan pelarut ekstraksi yang paling baik digunakan secara kuantitatif dan kualitatif adalah menggunakan asam fosfat. Hal-Hal yang perlu mendapat perhatian adalah bahwa perbandingan massa sampel dan volume ekstraktan dapat mempengaruhi efisiensi ekstraksi. Untuk meningkatkan rendemen ekstraksi, maka disarankan melakukan ekstraksi secara berkesinambungan (suksesif).

DAFTAR PUSTAKA

1. Ackley, K.J., B'Hymer, C., Sutton, K.L., Carusso, J.A., Speciation of arsenic in fish tissues using microwave-assisted extraction by HPLC-ICPMS, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 845-850, 1999.
2. Amran, B. Lagarde, F., Leroy, M., Lamotte, A., Demesmay, C. Ollé, M., Albert, M., Rauret, G. and Lopez-Sanchez, J., Arsenic speciation in environmental matrices, in *Quality Assurance for environmental analysis* (Eds. Quevauviller, Maier and Griekink), **Vol 17**, pp : 285-307. Elsevier Science, Amsterdam, 1995.
3. Ashley, P.M. and Lottermoser, B.G., Arsenic contamination at the Mole river mine, northern New South Wales, *Australian J. of Earth Sciences*, **46**, 861-874, 1999.
4. Becerio-González, E., de la Calzado, A.T., Alonzo-Rodriguez, E., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodriguez, D., Interaction between metallic species and biological substrate : approximation to possible interaction mechanism between the alga *Chlorella vulgaris* and As(III), *Trend in Analytical Chemistry*, **18**, 475, 2000
5. Benson, L.M., Porter, E.K., Peterson, P.J., Arsenic accumulation, tolerance, and genotype variation in plants on arsenical mine wastes in South-West England, *J. Plant Nutr.*, **3**, 655-666, 1981.
6. Bohari, Y., Astruc, A., Astruc, M., Cloud, J., *Improvements of Hydride Generation for the Speciation of Arsenic in Natural Freshwater Sample by HPLC-HG-AFS*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**, 774-778, 2001.
7. Bohari, Y., Lobos, G., Pinochet, H., Pannier, F., Astruc, A., Potin-Gautier, M., *Speciation of Arsenic in Plants by HPLC-HG-AFS : Extraction optimisation on CRM Materials and Application to Cultivated Samples*, *Journal of Environmental Monitoring*, **4**, 596-602, 2002.
8. Bohari, Y., Stoichev, T., Tsalev, D.L., Bosev, A., *Arsenic Speciation in Soils of a Copper Smelter in Pidrop, Bulgaria*, *Bulgarian Chemistry and Industry*, **78**, 2007.
9. Burló, F., Guijarro, I., Carbonell-Barrachina, A.A., Valero, D., Martinez-Sanchez, F., Arsenic species : effects on and accumulation by tomato plants, *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1247-1253, 1999.
10. Cai, Y., Geogriadis, M., Fourqurean, J.W., Determination of arsenic in seagrass using ICPMS, *Spectrochimica Acta Part B*, **55**, 1411-1422, 2000.
11. Campbell, M.J., Demesmay, C., Ollé, M., Determination of total arsenic concentration in biological matrices by ICP MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 1370-1384, 1994.

12. Caruso, J.A., Heitkemper, D.T., B'Hymer, C., An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple sample, *Analyst*, **126**, 136-140, 2001.
13. Chatterje, A., Determination of total cationic and total anionic arsenic species in oyster tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICPMS, *Talanta*, **51**, 303-314, 2000a.
14. Dagnac, T., Padro, A., Rubio, R., Rauret, G., Speciation of As in mussel by the coupled system liquid chromatography-UV irradiation-HGICPMS, *Talanta*, **48**, 763-772, 1999.
15. Damkröger, G., Grote, M., Joben, E., Comparison of sample digestion procedures for the determination of arsenic in certified samples using the FI-HG-AAS technique, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 817-821, 1997.
16. Darland, J.E. and Inskeep, W.P., Effects oh pH and phosphate competition on the transport of arsenate, *J. Environ. Qual.*, **26**, 1133-1139, 1997.
17. Demesmay, C., *Spéciation de l'arsenic par couplages chromatographie en phase liquide et méthodes spectrales d'analyse élémentaire spécifiques. Application à des sols et des sédiments* (Thèse doctorat , Université Claude Bernard (Lyon I), 1992).
18. Demesmay, C. and Ollé, M., Application of microwave digestion to the preparation of sediment samples for arsenic speciation, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, 1116-1121, 1997.
19. Feldmann, J., John, K., Pengprecha, P., Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **368**, 116-121, 2000.
20. Goessler, W., Maher, W., Irgolic, K.J., Kuehnelt, D., Schlagenhaufen, C., Kaise, T., Arsenic compounds in a marine food chain, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **359**, 434-437, 1997.
21. Goessler, W., Kuehnelt, D., Schlagenhaufen, C., Šlejkovec, Z., Irgolic, K.J., Arsenobetaine and other arsenic compounds in national council of Canada CRM DORM1 and DORM2, *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 183-187, 1998.
22. Gomez-Ariza, J.L., Sanchez-Rodas, D., Giraldez, I., Morales, E., A comparaision between ICP MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples, *Talanta*, **51**, 257-268, 2000a.
23. Gomez-Ariza, J.L., Sanchez-Rodas, D., Giraldez, I., Morales, E., Comparison of biota sample pretreatment for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICPMS, *Analyst*, **125**, 401-407, 2000b.
24. Hanoaka, K., Goessler, W., Unho, H., Irgolic, K.J., Kaise, T., Formation of toxic arsenical in roasted muscles of marine animals, *Appl. Organomet. Chem.*, **15**, 61-66, 2001.
25. Helgesen, H. and Larsen, E., Bioavailability and speciation of arsenic in carrots grown in contaminated soil, *Analyst*, **123**, 191-196, 1998.
26. Hunter, D.A., Goessler, W., Francesconi, K.A., Uptake of arsenate, trimethyl arsine oxide and arsenobetaine by shrimp Crangon-crangon, *Marine Biology*, **131**, 543-552, 1988.
27. Koch, I., Wang, C.A.L., Ollson, C.A., Cullen, W.R., Reimer, K.J., The predominance of inorganic arsenic species in plants from Yellowknife, Northwest territories Canada, *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 22-26, 2000 b.
28. Kuehnelt, D., Goessler, W., Schlagenhaufen, C., Irgolic, K.J., Arsenic compounds in terrestrial organisms : III. Arsenic compounds in *formica sp* from and old smelter site, *Appl. Organomet. Chem.*, **11**, 859-867, 1997b.
29. Kuehnelt, D., Lintschinger, J., Goessler, W., Arsenic compounds in terrestrial organisms : IV. Green plants and lichen from an old arsenic smelter site in Austria, *Appl. Organomet. Chem.*, **14**, 411-420, 2000.
30. Lagarde, F., Amran, M.B., Leroy, M.J.F., Demesmay, C., Ollé, M., Lamotte, A., Muntau, H., Michel, P., Thomas, P., Caroli, S., Larsen, E., Bonner, E., Rauret, G., Foulkes, M., Howard, A., Griepink, B., Maier, E.A., Improvement scheme for the determination of arsenic in mussel and fish tissues, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **363**, 5-11, 1999.
31. Lagarde, F., Amran, M.B., Leroy, M.J.F., Demesmay, C., Ollé, M., Lamotte, A., Muntau, H., Michel, P., Thomas, P., Caroli, S., Larsen, E., Bonner, E., Rauret, G., Foulkes, M., Howard, A., Griepink, B., Maier, E.A., Improvement scheme for the determination of arsenic in mussel and fish tissues, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **363**, 5-11, 1999c.
32. Lai, V.W.M., Cullen, W.R., Ray, S., Arsenic speciation in scallops, *Marine Chemistry*, **66**, 81-89, 1999.
33. Londesborough, S., Mattusch, J., Wennrich, R., Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICPMS, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **363**, 577-581, 1999.
34. Marin, A.R., Masscheleyn, P.H., Patrick Jr, W.H., Soil redox-pH stability of arsenic species and its influence on arsenic uptake by rice, *Plant and Soil*, **152**, 245-253, 1993.
35. Mattusch, J., Wennrich, R., Schmidt, A.C., Reisser, W., Determination of arsenic species in water, soil and plants, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **366**, 200-203, 2000.
36. McKiernan, J.W., Creed, J.T., Brockhoff, C.A., Lorenzana, R.M., A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish, *J. Anal. At. Spectrom.*, **14**, 607-613, 1999.
37. McSheehy, S. and Szpunar, J., Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICPMS and electrospray MS/MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.*, **15**, 79-87, 2000.

38. Monperrus, M., Spéciation de l'arsenic dans les sols et sédiments par extraction douce et couplage HPLC/HG/AFS, *Memoire pour l'obtention du diplôme d'études Approfondies de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour*, 2000
39. Muñoz, O., Vélez, D., Cervera, M.L., Montoro, R., Rapid and quantitative release, separation and determination of iorganic arsenic [As(III)+As(V)] in sea food products by microwave-assisted distillation and hydride generation atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom*, **14**, 1607-1613, 1999.
40. Schmidt, A.C., Reisser, W., Mattusch, J., Popp, P., Weinrich, R., Evaluation of arsenic species in plants materials, *J. of Chromatography*, **889**, 83-90, 2000.
41. Šlejkevce, Z., Byrne, A.R., Stijve, T., Goessler, W., Irgolic, K.J., arsenic compounds in higher fungi, *Appl. Organomet. Chem.*, **11**, 673-682, 1997.
42. Thomas, P., Finnie, J.K., Williams, J.G., Feasibility of identification and monitoring of arsenic species in soil and sediment samples by coupled high performance liquid chromatography- inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, 1367-1372, 1997.
43. Vergara-Gallardo, M , Optimisation du couplage HPLC/HG/AFS pour la spéciation de l'arsenic *Memoire pour l'obtention du diplôme d'études Approfondies de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour*, 1999.
44. Vergara-Gallardo, M., Bohari, Y., Astruc, A., Potin-Gautier, M., Astruc, M., Spéciation analysis of arsenic in environmental solid reference materials by HPLC-HG-AFS following orthophosphoric acid extraction, *Anal. Chim. Acta*, **441**, 257-268, 2001.

ISSN 1693-5616



9 771693 561604