

**Penentuan Amonia Terlarut dalam Limbah Cair di Kawasan
Peternakan Sapi Menggunakan Metode *Sequential Injection
Analysis* (SIA) Secara Spektrofotometri UV-Vis dengan Reagen
Acetoacetamilide (AAA)**

SKRIPSI

oleh :

KHUSNUL ILMIAH

155090200111021



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

**Penentuan Amonia Terlarut dalam Limbah Cair di Kawasan
Peternakan Sapi Menggunakan Metode *Sequential Injection
Analysis* (SIA) Secara Spektrofotometri UV-Vis dengan Reagen
Acetoacetanilide (AAA)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

oleh :

KHUSNUL ILMIAH

155090200111021



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Penentuan Amonia Terlarut dalam Limbah Cair di Kawasan
Peternakan Sapi Menggunakan Metode *Sequential Injection
Analysis* (SIA) Secara Spektrofotometri UV-Vis dengan Reagen
Acetoacetanilide (AAA)**

Oleh :
KHUSNUL ILMIAH
155090200111021

Setelah diseminarkan di depan Majelis Penguji
pada tanggal2...4...JUN 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Akhmad Sabarudin, S.Si, M. Sc., Dr.Sc
NIP. 197404181997021001

Pembimbing II

Dr. Ani Mulvasuryani, MS
NIP. 196306281991032001



Masduki, S.Si., M.Sc., Ph.D
NIP. 19731020 200212 1 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Khusnul Ilmiah
NIM : 155090200111021
Jurusan : Kimia

Penulis Skripsi Berjudul:
**Penentuan Amonia Terlarut dalam Limbah Cair di Kawasan
Peternakan Sapi Menggunakan Metode *Sequential Injection
Analysis* (SIA) Secara Spektrofotometri UV-Vis dengan Reagen
Acetoacetanilide (AAA)**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 17 Juni 2019

Yang menyatakan,



Khusnul Ilmiah
NIM: 155090200111021

Metode *Sequential Injection Analysis* (SIA) Secara Spektrofotometri UV-Vis Menggunakan Reagen *Acetoacetanilide* untuk Penentuan Amonia Terlarut dalam Limbah Cair di Kawasan Peternakan

ABSTRAK

Amonia adalah senyawa kimia yang berbahaya dalam konsentrasi yang tinggi di lingkungan. Sekitar 80-90% total emisi amonia berasal dari *manure* hewan yang berasal dari peternakan salah satunya peternakan sapi. Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 5 Tahun 2014 menjelaskan bahwa kadar amonia dalam baku mutu air limbah bagi kegiatan peternakan sebesar 25 mg/L. Beberapa metode penentuan amonia yang paling umum digunakan adalah spektrofotometri dan elektroda selektif. Namun, metode tersebut memiliki kelemahan yaitu memakan waktu dan memiliki sensitivitas yang rendah. Pada penelitian ini, bertujuan untuk menentukan amonia dalam aliran limbah cair di Kawasan peternakan sapi menggunakan metode *Sequential Injection Analysis* (SIA) secara spektrofotometri UV-Vis dengan *acetoacetanilide* (AAA) pada berbagai kondisi optimum. Berdasarkan reaksi Hantzsch, amonia akan bereaksi dengan reagen *acetoacetanilide* dan reagen asetat-formaldehid sehingga membentuk produk berupa turunan dihidropiridin yang akan terdeteksi oleh spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 307 nm. Urutan segmentasi yang digunakan berupa asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide*. Konsentrasi *acetoacetanilide* yang digunakan sebesar 0,06 M dengan laju alir sebesar 175 μ L/detik. Kondisi optimum pembentukan produk terjadi pada konsentrasi formaldehid 15%, perbandingan volume reagen dan sampel sebesar 75 μ L, 50 μ L, 100 μ L, dan waktu reaksi 40 detik. Pada penentuan amonia menggunakan metode *Sequential Injection Analysis* (SIA) dengan reagen *acetoacetanilide* pada reaksi Hantzsch memiliki sensitivitas yang tinggi dengan % recovery sebesar > 90,30 % dan nilai LOD sebesar 0,044 mg/L.

Kata kunci : Amonia, reaksi Hantzsch, *Sequential Injection Analysis*, amonia, reagen *acetoacetanilide*

Sequential Injection Analysis (SIA) Method by UV-Vis Spectrophotometry Using Acetoacetanilide Reagent to determine the Dissolved Ammonia in Liquid Waste in Cattle Farm Areas

ABSTRACT

Ammonia is a dangerous chemical compound if it is in high concentrations in the environment. About 80-90% of its total emissions come from animal liquid waste originating from livestock area including cattle farming. Minister of Environment Regulation, Number 5 of 2014 explains that the standard ammonia level in liquid waste for livestock activities is on 25 mg/L. Some of the most commonly used method in determining ammonia level are by using spectrophotometry and selective electrodes. However, the method has a disadvantage of being time consuming and having low sensitivity. This study aims to determine ammonia in the wastewater stream in the cattle farm area using the Sequential Injection Analysis (SIA) method by UV-Vis spectrophotometry with acetoacetanilide (AAA) at various optimum conditions. Based on the Hantzsch reaction, ammonia will react with the acetoacetanilide reagent and acetate-formaldehyde reagent so that it forms a product in the form of dihydropyridine derivatives which will be detected by the UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 307 nm. The segmentation sequence used was acetate formaldehyde – ammonia – acetoacetanilide. The acetoacetanilide concentration used was 0.06 M with a flow rate of 175 μ L/sec. The product formation optimum condition occurred at 15% formaldehyde concentration, the volume ratio of reagent and sample was 75 μ L, 50 μ L, 100 μ L, and reaction time of 40 seconds. The ammonia determination using the Sequential Injection Analysis (SIA) method with acetoacetanilide reagents in the Hantzsch reaction has a high sensitivity with % recovery of > 90.30 % and LOD value of 0.044 mg/L.

Keywords : *Ammonia, Hantzsch reaction, Sequential Injection Analysis, acetoacetanilide reagent*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan kelancaran serta kemudahan kepada penulis dalam penelitian serta penulisan skripsi dengan judul **“Penentuan Amonia Terlarut dalam Limbah Cair di Kawasan Peternakan Sapi Menggunakan Metode *Sequential Injection Analysis* (SIA) Secara Spektrofotometri UV-Vis dengan Reagen *Acetoacetanilide*”** sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya.

Penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa adanya bantuan dan kerjasama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Akhmad Sabarudin, S.Si., M.Sc., Dr.Sc dan Dr. Ani Mulyasuryani, MS. selaku dosen pembimbing I dan II atas segala bimbingan, pengarahan, dukungan dan masukan yang diberikan kepada penulis selama studi, pelaksanaan penelitian hingga penyusunan skripsi.
2. Dr. Ir. Uswatun Hasanah, M.Si, selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan bimbingan selama masa studi.
3. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, staf pengajar, dan semua karyawan Jurusan Kimia atas semua fasilitas dan bantuan yang diberikan.
4. Keluarga tercinta yaitu Ayahanda Sugeng Budiono dan Ibunda Huda Hariyati serta seluruh keluarga besar penulis di Mojokerto, atas do'a, motivasi, nasehat dan semua hal yang diberikan baik moril maupun materil.
5. Tim SIA (Puput Wahyuningsih, Rizky Mahardian Evitasari, Novita Dinda Isarah), Mbak Feli, Mbak Ika wurie, Mbak Wiwik dan teman-teman laboratorium kimia analitik yang telah membantu dan memberikan dukungan selama pelaksanaan penelitian.
6. Tim PKM DOTA 2 (Tomi Setiawan, Wahyu Yudhi Subekti dan Siti Sumadyah Nur Adya) Fini Apriyantina, Kartika Dwi Asni Putri, Diyah Nitami, Wildatus Sa'diyah Sugianto, Ardhyah Ayu Pratama, Ayu Arjulian, Kimia C 2015, Kimia angkatan 2015, Tim S.Si dan S.Pd (Yunan, Eli, Haffy, Arif, Vega) serta

seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya penelitian dan skripsi ini dengan baik.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan, mohon maaf apabila terdapat kesalahan, penulis mengharapkan kritik, saran dan masukan yang bersifat membangun untuk lebih melengkapi penulisan skripsi ini. Penulis juga berharap skripsi ini dapat bermanfaat serta menambah pengetahuan bagi pembacanya.

Malang, 17 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Amonia	7
2.2 Metode Penentuan Amonia	8
2.3 <i>Sequential Injection Analysis (SIA)</i>	10
2.4 Reaksi Hantzsch	12
2.5 Spektrofotometri UV-Visible	14
BAB METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	17
3.2.1 Alat-alat penelitian	17
3.2.2 Bahan-bahan penelitian	17
3.3 Tahapan Penelitian	18
3.4 Prosedur Kerja Penelitian	19
3.4.1 Preparasi larutan	19
a. Pembuatan reagen <i>acetoacetanilide</i> 0,06 M	19
b. Pembuatan reagen asetat-formaldehid 5-25%	19
c. Pembuatan larutan stok amonia 100 mg/L	19
d. Pembuatan larutan amonia 50 mg/L	19
e. Pembuatan larutan stok histidin, kreatin dan	

Urea 0,1 M	20
f. Pembuatan larutan histidin, kreatin dan urea 50 mg/L dan 100 mg/L	20
g. Pembuatan larutan standar amonia 0-11 mg/L	20
3.4.2. Pendeteksian larutan amonia	20
3.4.3 Optimasi parameter	21
a. Penentuan konsentrasi formaldehid optimum	21
b. Penentuan perbandingan volume reagen dan dan sampel optimum	22
c. Penentuan waktu reaksi optimum	22
3.4.4 Pembuatan kurva baku	23
3.4.5 Penentuan pengaruh matriks pengganggu histidin, kreatin, dan urea	23
3.4.6 Pengukuran LOD	24
3.4.7 Preparasi sampel	24
3.4.8 Pengukuran kadar amonia dalam sampel dan penentuan % <i>recovery</i>	24
3.4.9 Analisis data	25
a. Perhitungan persamaan korelasi linear dan koefisien korelasi	25
b. Perhitungan nilai rata-rata	25
c. Perhitungan standar deviasi	26
d. Perhitungan limit deteksi	26
e. Perhitungan kadar amonia	27
f. Perhitungan % <i>recovery</i>	27
g. Uji F (ANOVA Satu Jalur)	27
h. Uji BNT	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Optimasi Parameter	29
4.2 Pembuatan Kurva Baku	36
4.3 Uji Pengaruh Matriks Pengganggu	37
4.4 Pengukuran Amonia pada Sampel	39
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mekanisme reaksi kimia pembentukan kompleks indofenol dengan metode fenat	9
Gambar 2.2	Sistem <i>Sequential Injection Analysis</i>	11
Gambar 2.3	Struktur kimia <i>acetoacetanillide</i>	12
Gambar 2.4	Reaksi Hantzsch pada tahap pertama antara formaldehid dan <i>acetoacetanilide</i> membentuk intermediet 1	14
Gambar 2.5	Reaksi Hantzsch pada tahap kedua antara amonia dan <i>acetoacetanilide</i> membentuk intermediet 2	14
Gambar 2.6	Reaksi Hantzsch pada tahap 3 antara intermediet pertama dan intermediet kedua menghasilkan turunan dihidropiridina	14
Gambar 2.7	Prinsip kerja spektrofotometri UV-Visible	14
Gambar 3.1	Skema sistem SIA	21
Gambar 4.1	Grafik hubungan antara konsentrasi formaldehid dengan absorbansi produk reaksi Hantzsch	29
Gambar 4.2	Grafik hubungan antara perbandingan volume antara reagen dan sampel dengan absorbansi produk reaksi Hantzsch	31
Gambar 4.3	Zona produk dalam aliran <i>line</i>	32
Gambar 4.4	Grafik hubungan antara waktu reaksi dengan absorbansi produk reaksi Hantzsch	34
Gambar 4.5	Kurva baku penentuan amonia berdasarkan reaksi Hantzsch menggunakan metode SIA	36
Gambar L.H.1	SIA-gram optimasi konsentrasi formaldehid	79
Gambar L.H.2	SIA-gram optimasi perbandingan volume reagen dan sampel	79
Gambar L.H.3	SIA-gram optimasi waktu reaksi	80
Gambar L.H.4	SIA-gram pengukuran sampel 1	80
Gambar L.H.5	SIA-gram pengukuran sampel 2	81
Gambar L.H.6	SIA-gram pengukuran sampel 3	81

Gambar L.J.1	Rangkaian alat SIA	85
Gambar L.J.2	<i>Syringe pump</i> SIA	85
Gambar L.J.3	<i>Syringe valve</i> SIA	86
Gambar L.J.4	<i>Mixing tip</i>	86
Gambar L.J.5	Detektor spektrofotometer UV-Vis	87
Gambar L.J.6	<i>Acetoacetanillide</i>	87
Gambar L.J.7	Asam asetat glasial	88
Gambar L.J.8	Amonia <i>solution</i>	88
Gambar L.K.1	Sampling	89
Gambar L.K.2	Preparasi larutan sampel	89
Gambar L.L.1	Perintah pendeteksian amonia menggunakan aplikasi pada metode SIA	90

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Baku mutu air limbah peternakan	7
Tabel 3.1	: Tipe perbandingan volume reagen dan sampel	22
Tabel 4.1	: Data pengukuran konsentrasi amonia dengan penambahan matriks pengganggu	37
Tabel 4.2	: Hasil pengukuran amonia pada sampel	39
Tabel L.D.1	: Pembuatan larutan reagen asetat-formaldehid	58
Tabel L.D.2	: Pembuatan variasi konsentrasi amonia	65
Tabel L.E.1	: Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada optimasi konsentrasi formaldehid	66
Tabel L.E.2	: Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada optimasi perbandingan volume reagen dan sampel	66
Tabel L.E.3	: Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada optimasi waktu reaksi	67
Tabel L.E.4	: Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada berbagai konsentrasi (0-11 mg/L)	67
Tabel L.E.5	: Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada penambahan variasi konsentrasi matriks pengganggu	68
Tabel L.E.6	: Data pengukuran amonia pada sampel 1	69
Tabel L.E.7	: Data pengukuran amonia pada sampel 2	69
Tabel L.E.8	: Data pengukuran amonia pada sampel 3	69
Tabel L.F.1	: Uji statistik absorbansi optimasi konsentrasi Formaldehid	71
Tabel L.F.2	: Tabel analisis sidik ragam satu arah	72
Tabel L.F.3	: Uji statistik absorbansi optimasi waktu reaksi	73
Tabel L.F.4	: Tabel analisis sidik ragam satu arah	74
Tabel L.G.1	: Absorbansi blanko pada pengukuran amonia	76
Tabel L.G.2	: Absorbansi dan konsentrasi sampel setelah penambahan	77
Tabel L.I.1	: Kondisi operasional SIA	82

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A. Diagram Alir Penelitian	49
Lampiran B. Preparasi Larutan Sekunder	51
B.1 Pembuatan larutan stok AAA 0,2 M	51
B.2 Pembuatan etanol 40%	51
B.3 Pembuatan asam asetat 1 M	51
B.4 Pembuatan larutan natrium asetat 1 M	51
B.5 Pembuatan larutan buffer asetat pH 6	51
Lampiran C. Preparasi Alat SIA	52
C.1 Perangkaian alat SIA	52
C.2 Pencucian pipa kapiler (<i>line</i>)	52
C.3 Pengisian <i>line</i>	52
Lampiran D. Perhitungan Preparasi Larutan	54
D.1 Perhitungan pembuatan etanol 40%	54
D.2 Perhitungan pembuatan larutan AAA 0,2 M	54
D.3 Perhitungan pembuatan larutan reagen AAA 0,06 M	54
D.4 Perhitungan pembuatan asam asetat 1 M	55
D.5 Perhitungan pembuatan natrium asetat 1 M	55
D.6 Perhitungan pembuatan larutan buffer asetat pH 6	56
D.7 Perhitungan pembuatan variasi konsentrasi asetat-formaldehid 5-25%	57
D.8 Perhitungan pembuatan larutan stok histidin 0,1 M	58
D.9 Perhitungan pembuatan larutan stok histidin 100 mg/L	58
D.10 Perhitungan pembuatan larutan stok histidin 50 mg/L	59
D.11 Perhitungan pembuatan larutan stok kreatin 0,1 M	59
D.12 Perhitungan pembuatan larutan stok kreatin 100 mg/L	60
D.13 Perhitungan pembuatan larutan stok kreatin 50 mg/L	60
D.14 Perhitungan pembuatan larutan stok urea 0,1 M	61

D.15 Perhitungan pembuatan larutan stok urea 100 mg/L	61
D.16 Perhitungan pembuatan larutan stok urea 50 mg/L	62
D.17 Perhitungan pembuatan larutan stok amonia 100 mg/L	63
D.18 Perhitungan pembuatan larutan amonia 50 mg/L	63
D.19 Perhitungan pembuatan larutan standar 0-11 mg/L	64
Lampiran E. Data Hasil Penelitian	66
E.1 Optimasi konsentrasi formaldehid	66
E.2 Optimasi perbandingan volume reagen dan sampel	66
E.3 Optimasi waktu reaksi	67
E.4 Kurva baku produk reaksi Hantzsch	67
E.5 Uji pengaruh matriks pengganggu pada penguku- ran amonia	68
E.6 Pengukuran sampel 1 (aliran limbah cair labora- torium lapang Fakultas Peternakan UB)	69
E.7 Pengukuran sampel 2 (aliran limbah cair peterna- kan di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang)	69
E.8 Pengukuran sampel 3 (aliran limbah cair peterna- kan di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang)	69
F. Uji Statistik Optimasi Parameter	71
Lampiran G. Perhitungan Limit Deteksi dan % <i>Recovery</i>	76
Lampiran H. SIA-gram Pengukuran	79
Lampiran I. Kondisi Operasional SIA	82
Lampiran J. Dokumentasi Alat dan Bahan	85
Lampiran K. Dokumentasi Sampling dan Preparasi Sampel	89
Lampiran L. Contoh Tampilan Perintah	90
Lampiran M. PERMEN LH Nomor 5 Tahun 2014	91

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan

AAA

SK

SNI

FIA

SIA

LOD

SP

SD

RSD

Keterangan

Acetoacetanilide

Surat keputusan

Standar Nasional Indonesia

Flow Injection Analysis

Sequential Injection Analysis

Limit of Detection

Syringe Pump

Standar Deviasi

Relatif Standar Deviasi

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Amonia merupakan senyawa kimia berupa gas, tidak berwarna dan memiliki aroma tajam yang khas [1]. Amonia memiliki kelarutan dalam air sebesar 89,9 g/100 mL pada 0°C dan 31 g/100 g pada 25°C. Sumber emisi amonia dalam air berasal dari pupuk, *manure* hewan dan sebagian kecil dari industri. Sekitar 80-90% total emisi amonia berasal dari *manure* hewan yang dihasilkan dari peternakan salah satunya peternakan sapi [2]. Amonia yang dihasilkan dari peternakan sapi berasal dari limbah padat dan limbah cair. Peternakan sapi rata-rata menghasilkan limbah cair sebesar 4,5-11 L/hari/ekor dengan komposisi kandungan 1.200-2.900 mg/L merupakan nitrogen total, 780-2.200 mg/L amonia dan 64-500 mg/L phosphor [3]. Unsur nitrogen total yang terkandung rata-rata berupa 69% urea, 7,3% allantoin, 5,8% asam hippuric, 3,7% kreatinin, 2,5% kreatin, 1,3% asam uric, 0,5% xantin dan hipoxantin, serta 1,3 % asam amino bebas. Asam amino bebas yang terkandung dalam nitrogen total tersebut antara lain berupa alanin (3,75%), β -alanin (0,3%), 2-aminobutanoic acid (0,2%), 2-methyl-3-amino-propanoic acid (1,6%), arginin (1,6%), asam aspartat (1,4%), asam sisteic (1,4%), asam glutamic (1,8%), glisin (53,3 %), histidin (0,8%), 1-methyl histidine (3,3%), 3-methyl histidine (3,45%), isoleusin (0,0%), leusin (0,3%), lisin (1,8%), ornitin (0,6%), taurin (17,25%) [4].

Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 5 Tahun 2014 menjelaskan bahwa kadar amonia dalam baku mutu air limbah bagi kegiatan peternakan sebesar 25 mg/L [5]. Kegiatan sektor peternakan yang semakin meningkat dapat berpotensi mencemari lingkungan apabila pengolahan hasil maupun limbahnya tidak diolah dan dikontrol terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan perairan. Berdasarkan SK Menteri Pertanian No.237 tahun 1991 dan SK Menteri Pertanian No. 752 tahun 1994, menyatakan bahwa usaha peternakan dengan populasi tertentu perlu dilengkapi dengan upaya

pengelolaan dan pemantauan lingkungan. Pada usaha peternakan sapi evaluasi terhadap dampak lingkungan dilakukan dengan jumlah ternak lebih dari 20 ekor [6]. Dalam jumlah yang tinggi, amonia dapat berbahaya bagi lingkungan, seperti penurunan kualitas udara dan emisi gas rumah kaca. Selain itu juga berdampak buruk bagi kesehatan manusia. Apabila masuk dalam saluran pernapasan maka dapat merusak saluran pernapasan bagian atas dan menyebabkan iritasi pada mata [7]. Metode dalam penentuan kadar amonia terlarut dalam limbah cair yang cepat dan akurat sangat diperlukan untuk penanganan terhadap kadar amonia yang tinggi pada lingkungan perairan.

Metode standar yang digunakan dalam penentuan kadar amonia diantaranya adalah metode standar fenat berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-6989.30-20051 dan metode standar indopenol berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 19-7119.1-2005 dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kelemahan dari kedua metode tersebut adalah mekanisme reaksi yang relatif rumit dan perlu melalui beberapa tahapan, memerlukan waktu yang lama serta memiliki batas deteksi 0,170 mg/L dan ketelitian 10,84% [8]. Beberapa metode lain yang dapat digunakan dalam penentuan kadar amonia diantaranya kromatografi ion, elektroda pemurnian gas amonia, fluorometri serta *chemiluminescence*. Pada metode kromatografi ion, memiliki kelemahan yaitu resin yang digunakan adalah resin penukar kation yang kurang baik jika digunakan pada kation berbasa lemah. Sedangkan resin penukar anion bersifat basa lemah hanya baik bereaksi dengan anion asam kuat [9]. Selain itu kesalahan relatif pada saat pengukuran menggunakan metode sebesar 20% [10]. Pada metode elektroda selektif amonia dalam sampel lingkungan perairan memiliki kelemahan yaitu rentan terhadap gangguan amina, memiliki waktu kesetimbangan yang lambat dan sensitivitas yang rendah sebesar 0,07 mg/L [11].

Saat ini, penentuan kadar amonia dapat dilakukan dengan menggunakan metode analisis aliran otomatis menggunakan *Flow Injection Analysis* (FIA) dan aliran otomatis *online* menggunakan *Sequential Injection Analysis* (SIA). Berdasarkan penelitian Ying Liang [12], penentuan kadar nitrogen amonia dalam air dapat dilakukan dengan metode *Flow Injection Analysis* yang didasarkan pada reaksi NH_3 -*o-phthalaldehyde*- Na_2SO_3 yang memiliki limit deteksi yang rendah hingga 0,117 mg/L. Pada metode *Sequential Injection Analysis*, sistem ini dikontrol menggunakan komputer dan terdiri dari *syringe pump*, *holding coil*, koil rekasi, katup multiposisi, dan detektor. Seluruh komponen tersebut dihubungkan satu dengan yang lain menggunakan pipa kapiler PTFE. Kelebihan metode *Sequential Injection Analysis* adalah memerlukan jumlah reagen yang sangat sedikit, analisis secara cepat dan otomatis, serta limbah yang dihasilkan sedikit [13]. Berdasarkan penelitian Giakisikli [14], penentuan kadar amonia dengan metode *Sequential Injection Analysis* yang digabungkan dengan detektor flourimetrik menggunakan reaksi NH_3 -*o-phthalaldehyde*- Na_2SO_3 pada kondisi alkali (pH 11), memiliki limit deteksi antara 0,06 – 4 mg/L.

Pada penelitian Sardesai [15], menjelaskan bahwa penentuan kadar amonia dapat dilakukan dengan metode fluorometrik menggunakan reaksi Hantzsch. Mekanisme reaksi Hantzsch terjadi antara β -keto ester, formaldehid, dan amonia yang dapat bereaksi membentuk larutan kompleks berupa *3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine* [16]. Berdasarkan penelitian Qiong Li [17], pada reaksi Hantzsch β -keto ester yang digunakan berupa *methyl acetoacetate*, *ethyl acetoacetate*, *n-propyl acetoacetate*, *n-amyl acetoacetate*, *malonic acid*, *dimethyl malonate*, *acetylacetone*, dan *acetoacetanilide*. *Acetoacetanilide* dapat digunakan sebagai reagen baru pada reaksi Hantzsch karena memiliki sensitivitas yang tinggi dengan nilai ekstingsi molar yang paling besar pada 25°C sebesar $6100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$ dibandingkan dengan yang lainnya. Pada reaksi Hantzsch, dua molekul *acetoacetanilide* yang terlibat dalam reaksi, satu molekul

akan bereaksi dengan formaldehid dan satu molekul lainnya akan bereaksi dengan amonia untuk membentuk zat antara tipe enamina, yang diikuti oleh siklodehidrasi untuk menghasilkan turunan *dihydropyridine*.

Dalam penelitian ini, penentuan kadar amonia dilakukan dengan menggunakan metode *Sequential Injection Analysis* (SIA) secara spektrofotometri UV-Vis yang dikombinasikan menggunakan reagen *acetoacetanilide* dan reagen asetat-formaldehid dalam reaksi Hantzsch. Beberapa optimasi parameter yang dilakukan meliputi konsentrasi formaldehid dalam reagen asetat-formaldehid, perbandingan volume segmentasi reagen *acetoacetanilide*, reagen asetat-formaldehid dan amonia, serta waktu reaksi. Pengujian terhadap pengaruh gangguan matriks berupa asam amino (histidin), kreatin dan urea sebagai produk nitrogen total lain yang terkandung dalam limbah cair peternakan dilakukan dalam penentuan kadar amonia untuk mengetahui seberapa besar gangguan nitrogen total lain tersebut terhadap pengukuran amonia. Selain itu sensitivitas dan validitas metode dilakukan berdasarkan nilai LOD dan % *recovery* untuk penentuan amonia dalam sampel limbah cair di kawasan peternakan.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang dapat dirumuskan berdasarkan latar belakang, yaitu:

1. Bagaimana kondisi optimum (konsentrasi formaldehid dalam reagen asetat-formaldehid, perbandingan volume reagen dan sampel, serta waktu reaksi,) pada penentuan amonia menggunakan SIA?
2. Bagaimana gangguan matriks berupa asam amino bebas (histidin), kreatin dan urea pada penentuan amonia menggunakan SIA?

3. Bagaimana aplikasi SIA dan validitas metode SIA berdasarkan nilai LOD dan % *recovery*, untuk penentuan amonia dalam sampel limbah cair peternakan sapi?

1.3 Batasan Masalah

Pada penelitian ini ada beberapa batasan masalah yang diambil, yaitu:

1. Amonia yang akan ditentukan dengan metode ini berupa amonia terlarut dalam limbah cair peternakan.
2. Reagen *acetoacetanilide* yang digunakan dalam bentuk reagen yang larut dalam etanol 40%.
3. Formaldehid yang digunakan dalam bentuk larutan reagen yang dibuat dari formaldehid 40% dan buffer asetat pH 6.
4. Sampel yang digunakan berasal dari tiga kawasan peternakan di Kabupaten Malang, yaitu aliran limbah Laboratorium Lapang Fakultas Peternakan UB (sampel 1), aliran limbah peternakan warga di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang (sampel 2), dan aliran limbah peternakan warga di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang (Sampel 3).
5. Sampel yang digunakan tanpa pengawetan dan pengukuran sampel dilakukan pada hari yang sama dengan pengambilan sampel.
6. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 307 nm.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukan penelitian ini yaitu:

1. Menentukan kondisi optimum kondisi optimum (konsentrasi formaldehid dalam reagen asetat-formaldehid, perbandingan volume reagen dan sampel, serta waktu reaksi) pada penentuan amonia menggunakan SIA.

2. Menentukan gangguan matriks berupa asam amino bebas (histidin), kreatin dan urea pada penentuan amonia menggunakan SIA.
3. Mengaplikasikan SIA dan menentukan validitas metode berdasarkan nilai LOD dan % *recovery* untuk penentuan amonia dalam sampel limbah cair peternakan sapi.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan inovasi baru dalam melakukan analisa kandungan amonia pada limbah cair peternakan menggunakan metode yang sederhana, cepat dan memiliki efisiensi yang tinggi. Selain itu, dapat mengetahui pengaruh jenis matriks yang dapat mengganggu dalam analisa kandungan amonia pada limbah cair peternakan. Adanya metode baru dalam penentuan amonia tersebut kandungan amonia dalam limbah cair dapat dengan cepat terdeteksi sehingga potensinya sebagai salah satu sumber pencemar lingkungan dapat diatasi lebih awal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Amonia

Amonia merupakan senyawa kimia yang memiliki rumus kimia NH_3 dengan berat molekul sebesar 17,03 g/mol. Senyawa ini berupa gas dan tidak berwarna. Amonia memiliki aroma tajam yang khas. Beberapa sifat lain diantaranya amonia memiliki titik beku sebesar $-77,74^\circ\text{C}$, memiliki titik didih sebesar $-33,35^\circ\text{C}$, memiliki berat jenis yang lebih ringan dibandingkan berat jenis udara yakni sebesar 0,6. Amonia memiliki sifat basa, pada suhu 25°C larutan amonia pekat mengandung 28%-29% amonia, amonia memiliki kelarutan dalam air sebesar 89,9 g/100 mL (0°C) dan 31 g/100 g (25°C) [1].

Sumber emisi amonia dalam air berasal dari pupuk, *manure* hewan dan sebagian kecil dari industri. Sekitar 80-90% total emisi amonia berasal dari *manure* hewan yang dihasilkan dari peternakan salah satunya peternakan sapi [2]. Amonia yang dihasilkan dari peternakan sapi berasal dari limbah padat dan limbah cair. Peternakan sapi rata-rata menghasilkan limbah cair sebesar 4,5-11 L/hari/ekor. dengan komposisi kandungan 1.200-2.900 mg/L merupakan nitrogen total, 780-2.200 mg/L amonia dan 64-500 mg/L phosphor [3].

Tabel 2.1 Baku mutu air limbah peternakan [18]

Parameter	Kadar paling Tinggi (mg/L)	Beban Pencemaran Paling Tinggi (gram/ekor/hari)	
		Sapi	Babi
BOD	100	20	4
COD	200	40	8
TSS	100	20	4
NH_3	25	5	1
pH		6,9	
Kuantitas air limbah paling tinggi		Sapi : 200 L/ekor/hari	Babi : 40 L/ekor/hari

Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 5 Tahun 2014 menjelaskan bahwa kadar amonia dalam baku mutu air limbah bagi kegiatan peternakan sebesar 25 mg/L [5]. Kegiatan sektor peternakan yang semakin meningkat dapat berpotensi mencemari lingkungan apabila pengolahan hasil maupun limbahnya tidak diolah dan dikontrol terlebih dahulu sebelum dibuang ke lingkungan perairan. Berdasarkan SK Menteri Pertanian No.237 tahun 1991 dan SK Menteri Pertanian No. 752 tahun 1994, menyatakan bahwa usaha peternakan dengan populasi tertentu perlu dilengkapi dengan upaya pengelolaan dan pemantauan lingkungan. Pada usaha peternakan sapi evaluasi terhadap dampak lingkungan dilakukan dengan jumlah ternak lebih dari 20 ekor [6]. Dalam jumlah yang tinggi, amonia dapat berbahaya bagi lingkungan, seperti penurunan kualitas udara dan emisi gas rumah kaca. Selain itu juga berdampak buruk bagi kesehatan manusia. Apabila masuk dalam saluran pernapasan maka dapat merusak saluran pernapasan bagian atas dan menyebabkan iritasi pada mata [19].

2.2 Metode Penentuan Amonia

Metode standar yang digunakan dalam penentuan kadar amonia diantaranya adalah metode standar fenat berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 06-6989.30-20051 dan metode standar indopenol berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) 19-7119.1-2005 dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prinsip dari metode tersebut adalah amonia direaksikan dengan natrium hipoklorit sehingga membentuk senyawa antara monoklorokuinon, senyawa tersebut akan bereaksi dengan sisa reagen fenolat membentuk senyawa indophenol yang berwarna biru. Reaksi metode tersebut sebagai berikut [20]:



Gambar 2.1 Mekanisme reaksi kimia pembentukan kompleks indofenol dengan metode fenat [20].

Metode standar yang digunakan tersebut memiliki kelemahan yaitu mekanisme yang relatif cukup rumit dan melalui beberapa tahapan, memerlukan waktu yang lama serta memiliki batas deteksi 0,170 mg/L dan ketelitian 10,84% [19]. Pada metode kromatografi ion, memiliki kelemahan yaitu resin yang digunakan adalah resin penukar kation yang kurang baik jika digunakan pada kation berbasis lemah. Sedangkan resin penukar anion bersifat basa lemah hanya baik bereaksi dengan anion asam kuat [9]. Selain itu kesalahan relatif pada saat pengukuran menggunakan metode tersebut sebesar 20% [10]. Pada metode elektroda selektif

amonia pada sampel lingkungan perairan memiliki kelemahan yaitu rentan terhadap gangguan amina, memiliki waktu kesetimbangan yang lambat dan sensitivitas yang rendah sebesar 0,07 mg/L [11].

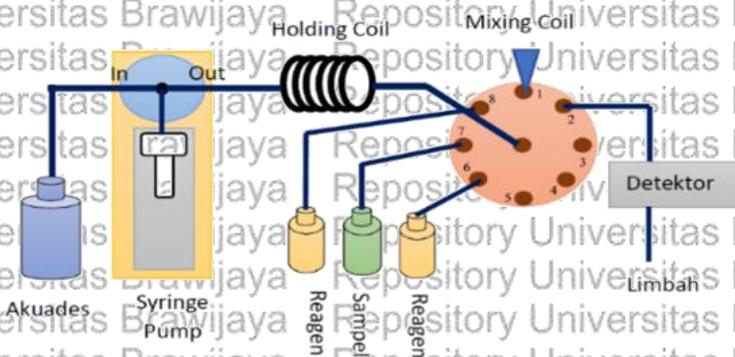
Saat ini, penentuan kadar amonia dapat dilakukan dengan menggunakan metode analisis aliran otomatis menggunakan *Flow Injection Analysis* (FIA) dan aliran otomatis *online* menggunakan *Sequential Injection Analysis* (SIA). Berdasarkan penelitian Ying Liang [12], penentuan kadar nitrogen amonia dalam air dapat dilakukan dengan metode *Flow Injection Analysis* yang didasarkan pada reaksi $\text{NH}_3\text{-o-phthalaldehyde-Na}_2\text{S O}_3$ yang memiliki limit deteksi yang rendah hingga 0,117 mg/L. Pada metode *Sequential Injection Analysis*, sistem ini dikontrol menggunakan komputer dan terdiri dari *syringe pump*, *holding coil*, katup multiposisi, dan detektor. Seluruh komponen tersebut dihubungkan satu dengan yang lain menggunakan pipa kapiler PTFE. Kelebihan metode *Sequential Injection Analysis* adalah memerlukan jumlah reagen yang sangat sedikit, analisis secara cepat dan otomatis, serta limbah yang dihasilkan sedikit [13]. Berdasarkan penelitian Giakisikli [14], penentuan kadar amonia dengan metode *Sequential Injection Analysis* yang digabungkan dengan detektor flourimetrik menggunakan reaksi $\text{NH}_3\text{-o-phthalaldehyde-Na}_2\text{SO}_3$ pada kondisi alkali (pH 11), memiliki limit deteksi antara 0,06 – 4 mg/L. Meskipun kedua metode memiliki kelebihan cepat dan sederhana, namun keduanya memiliki kekurangan berupa penggunaan reagen sulfit dan *o-phthalaldehyde* yang berbahaya.

2.3 Sequential Injection Analysis (SIA)

Sequential Injection Analysis merupakan metode analisis aliran otomatis generasi kedua yang diusulkan oleh Ruzicka dan Marshall pada tahun 1990. SIA menawarkan suatu metode pengambilan sampel secara tepat, cepat dan efisien. SIA secara luas diterapkan untuk penentuan beberapa spesies dalam berbagai matriks [21]. Seperti halnya FIA, SIA adalah teknik aliran kontinu tidak tersegmentasi yang

didasarkan pada persamaan prinsip yang dikontrol oleh dispersi dengan konsep alirannya dapat diprogram dengan komputer [22]. Sistem ini dikontrol menggunakan komputer dan terdiri dari *syringe pump*, *holding coil*, katup multiposisi, dan detektor. Seluruh komponen tersebut dihubungkan satu dengan yang lain menggunakan pipa kapiler PTFE [11]. Keutungan penggunaan metode SIA dibandingkan dengan FIA adalah mudah digunakan, konsumsi reagen yang lebih sedikit, kemudahan dalam memvariasikan parameter, kemudahan kalibrasi, dan kesederhanaan dari manifold saluran tunggal yang digunakan [23].

Pada mekanisme kerja SIA, awalnya *holding coil* diisi larutan pembawa. *Valve selection* dihubungkan ke *port* sampel. Selanjutnya sejumlah sampel diambil ke *holding coil* oleh pompa. Volume sampel yang dialirkan ke *holding* ditentukan oleh produk dari laju alir pompa dan waktu pengambilan sampel. *Valve selection* kemudian dihubungkan ke *port* reagen. Sejumlah reagen diambil ke dalam *holding coil* yang berbatasan langsung dengan sampel oleh pompa. Selanjutnya sampel dan reagen bergerak menuju *mixing coil*/ koil rekasi untuk pencampuran reaksi. Kemudian *Valve selection* dihubungkan ke detektor. Pompa mengalirkan sampel dan reagen ke detektor. Spesies yang terdeteksi membentuk sinyal berupa puncak yang dibaca oleh detektor [21].



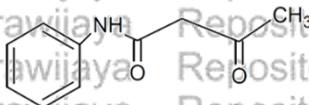
Gambar 2.2 Sistem *Sequential Injection Analysis* [21]

2.4 Reaksi Hantzsch

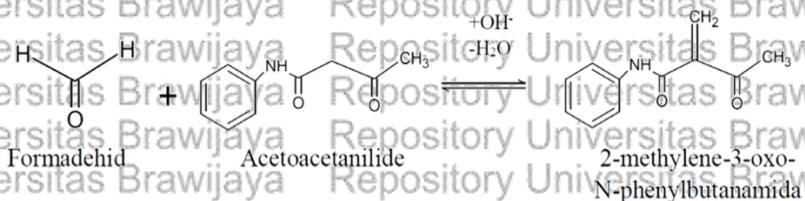
Reaksi Hantzsch merupakan reaksi yang melibatkan siklisasi amina, aldehida dan β -diketon untuk membentuk sebuah produk turunan *dihydropyridine*. Reaksi Hantzsch dikembangkan oleh Arthur Hantzsch pada tahun 1882. Reaksi Hantzsch sering digunakan dalam penentuan secara spektrofotometri dan fluorometric [17]. Mekanisme reaksi Hantzsch terjadi antara β -keto ester, formaldehid, dan amonia yang dapat bereaksi membentuk larutan kompleks berupa *3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine* [16].

Berdasarkan penelitian Qiong Li [17], pada reaksi Hantzsch β -keto ester yang digunakan berupa *methyl acetoacetate*, *ethyl acetoacetate*, *n-propyl acetoacetate*, *n-amyl acetoacetate*, *malonic acid*, *dimethyl malonate*, *acetylacetone*, dan *acetoacetanilide*. *Acetoacetanilide* dapat digunakan sebagai reagen baru pada reaksi Hantzsch karena memiliki selektivitas yang tinggi dengan nilai ekstingsi molar yang paling besar pada 25°C sebesar 6100 dm³mol⁻¹ dibandingkan dengan yang lainnya serta tidak melibatkan aldehida lain, seperti asetaldehida atau benzaldehida. Pada reaksi Hantzsch, dua molekul *acetoacetanilide* yang terlibat dalam reaksi, satu molekul akan bereaksi dengan formaldehid dan satu molekul lainnya akan bereaksi dengan amonia untuk membentuk zat antara tipe enamim, yang diikuti oleh siklodehidrasi untuk menghasilkan turunan *dihydropyridine* seperti pada gambar 2.3.

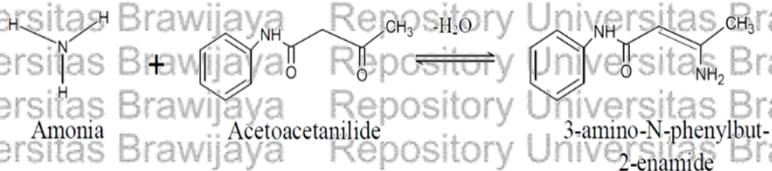
Acetoacetanilide memiliki rumus kimia C₁₀H₁₁NO₂ seperti pada gambar 2.3, memiliki bentuk bubuk kristal berwarna putih, dapat larut dalam etanol, kloroform, etil eter, benzene panas dan minyak eter panas. *Acetoacetanilide* termasuk dalam zat yang tidak berbahaya dan memiliki tingkat elergen yang rendah [24].



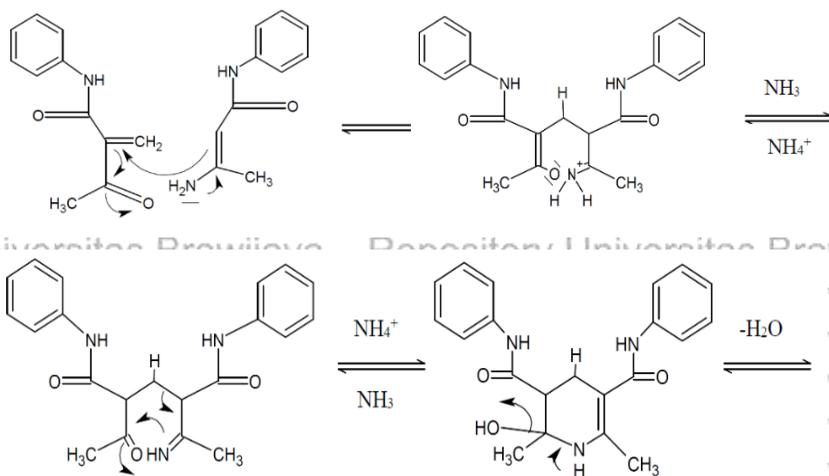
Gambar 2.3 Struktur kimia *acetoacetanilide* [25].

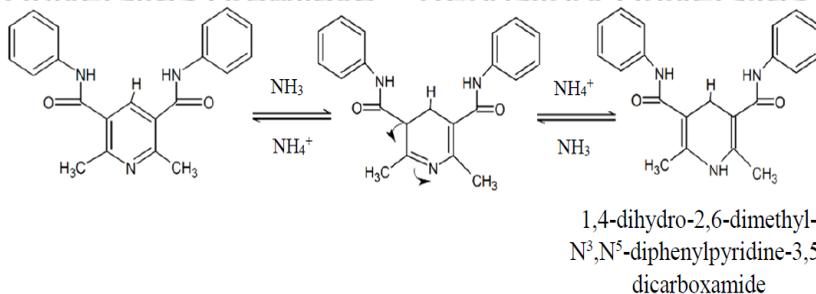


Gambar 2.4 Reaksi Hantzsch pada tahap pertama antara formaldehid dan *acetoacetanilide* membentuk intermediet 1 yaitu *Knoevenagel Condensation product*



Gambar 2.5 Reaksi Hantzsch pada tahap kedua antara amonia dan *acetoacetanilide* membentuk intermediet 2 yaitu enamida

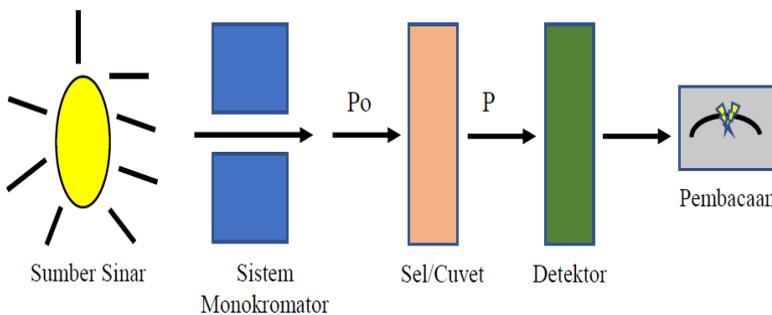




Gambar 2.6 Reaksi Hantzsch pada tahap 3 antara intermediet pertama dan intermediet kedua menghasilkan turunan dihidropiridina

2.5 Spektrofotometri UV Visible

Spektrofotometri UV-Visible merupakan instrumen analisis yang penting dalam laboratorium modern, dan telah digunakan secara umum selama 35 tahun terakhir. Alat tersebut dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi yang diserap dalam larutan. Dalam banyak aplikasi, spektrofotometri UV-Visible lebih sederhana, mudah digunakan, lebih cepat, lebih akurat dan lebih murah jika dibandingkan dengan teknik yang lainnya [26]. Spektrofotometri UV-Visible dapat menyelidiki interaksi antara radiasi cahaya dengan materi pada panjang gelombang 200-400 nm untuk daerah ultraviolet dan pada 400-800 nm untuk daerah Visible [27].



Gambar 2.5 Prinsip kerja spektrofotometri UV-Visible

Prinsip kerja dari spektrofotometri UV-Visible adalah suatu sumber cahaya yang dipancarkan melalui monokromator diuraikan menjadi pita-pita panjang gelombang yang diinginkan dalam pengukuran suatu zat tertentu. Cahaya/ energi dari monokromator kemudian diteruskan dan diserap oleh larutan yang diperiksa di dalam kuvet. Jumlah cahaya yang telah diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor. Sinyal elektrik tersebut besarnya sebanding dengan cahaya yang diserap larutan. Pada metode spektrofotometri UV-Visible didasarkan pada hukum Lambert-Beer yang menyatakan bahwa jumlah radiasi cahaya tampak, ultraviolet, dan cahaya lainnya yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi suatu zat dan tebal larutan.

Secara matematis hukum Lambert – Beer dapat dituliskan [28] :

$$T = I_t/I_0 = 10^{-\epsilon \cdot b \cdot c}$$

$$A = \log I/T = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Dimana T = Transmittan, I_0 = Intensitas sinar yang datang, I_t = Intensitas radiasi yang diteruskan, ϵ = Absorbansi molar ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), c = Konsentrasi ($mol \cdot L^{-1}$), B = Tebal larutan (cm) dan A = Absorbansi

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dan perancangan alat dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik dan UPT Instrumentasi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang selama empat bulan mulai Januari sampai April 2019.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, neraca analitis Mettler, botol semprot, dan seperangkat alat SIA (*laboratory made SIA system*) yang terdiri dari *syringe pump* (SP; Hamilton, Reno, Nevada, USA) dengan volume 2500 μL , delapan katup *selection valve* (SP; Hamilton, Reno, Nevada, USA), detektor berupa spektrofotometer UV-Vis (UV-1601 Shimadzu) dan kuvet detektor kolorimeter RGB-LED yang dikontrol komputer menggunakan *home-made software* berbasis *Visual Basic Program*, pipa kapiler (PTFE 0,75 mm i.d), pipa kapiler untuk *holding coil* (PTFE 1,8 mm i.d), pH meter (Mettler), mikropipet P200 dan P5000.

3.2.2 Bahan-bahan penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan-bahan kimia pro analisis (p.a), yaitu amonia 25%, padatan *acetoacetanilide*, formaldehid 40%, padatan natrium asetat, asam asetat 100%, etanol 95%, padatan histidin, padatan kreatin, dan padatan urea, kecuali akuades serta tiga sampel limbah cair dari tiga kawasan peternakan sapi di Kabupaten Malang (diambil dari aliran limbah laboratorium lapang Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, aliran limbah peternakan di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang, dan aliran limbah peternakan di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang).

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi bahan
2. Preparasi larutan
 - a. Pembuatan etanol 40%
 - b. Pembuatan larutan stok *acetoacetanilide* 0,2 M
 - c. Pembuatan larutan reagen *acetoacetanilide* 0,06 M
 - d. Pembuatan larutan natrium asetat 1 M
 - e. Pembuatan larutan asam asetat 1 M
 - f. Pembuatan larutan buffer asetat pH 6
 - g. Pembuatan reagen asetat-formaldehid 5-25%
 - h. Pembuatan larutan stok amonia 100 mg/L
 - i. Pembuatan larutan amonia 50 mg/L
 - j. Pembuatan larutan standar amonia 0-11 mg/L
 - k. Pembuatan larutan stok matriks pengganggu histidin, kreatin, dan urea 0,1 M
 - l. Pembuatan larutan matriks pengganggu histidin, kreatin dan urea 50 dan 100 mg/L
3. Preparasi alat SIA
 - a. Perangkaian alat SIA
 - b. Pencucian pipa kapiler
 - c. Pengisian *line*
 - d. Pendeteksian larutan amonia
4. Optimasi parameter
 - a. Penentuan konsentrasi formaldehid optimum
 - b. Penentuan perbandingan volume reagen dan sampel
 - c. Penentuan waktu reaksi optimum
5. Pembuatan kurva baku
6. Penentuan pengaruh uji matriks pengganggu histidin, kreatin dan urea

7. Pengukuran LOD
8. Preparasi sampel
9. Pengukuran kadar amonia dalam sampel dan penentuan % *recovery*
10. Analisis data

3.4 Prosedur Kerja Penelitian

3.4.1 Preparasi larutan

a. Pembuatan reagen *acetoacetanilide* 0,06 M

Larutan stok AAA 0,2 M yang dibuat sesuai prosedur pada lampiran B.1 diambil sebanyak 15 mL menggunakan pipet ukur 10 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Kemudian diencerkan dengan etanol 40% hingga tepat tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

b. Pembuatan reagen asetat-formaldehid 5-25%

Larutan stok formaldehid 40% diambil sebanyak 1,25; 2,5; 3,75; 5; 6,25 mL menggunakan mikropipet P5000 dan dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL. Kemudian diencerkan dengan larutan buffer asetat pH 6 yang dibuat sesuai prosedur pada lampiran B.4 hingga tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen.

c. Pembuatan larutan stok amonia 100 mg/L

Larutan stok amonia 25% diambil sebanyak 43 μ L menggunakan mikropipet P200 dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL. Kemudian diencerkan dengan akuades hingga tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen.

d. Pembuatan larutan amonia 50 mg/L

Larutan amonia 100 mg/L diambil sebanyak 5 mL menggunakan pipet ukur 5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. kemudian ditambahkan dengan akuades hingga tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen.

e. Pembuatan larutan stok histidin, kreatin, dan urea 0,1 M

Padatan histidin, kreatin, dan urea masing-masing ditimbang sebanyak 0,155 g, 0,165 g, 0,131 g kemudian dilarutkan dengan akuades dalam gelas beaker 20 mL. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen.

f. Pembuatan larutan histidin, kreatin, dan urea 50 mg/L dan 100 mg/L

Larutan stok histidin, kreatin, dan urea 0,1 M masing-masing diambil sebanyak 32 μ L, 38 μ L, 83 μ L menggunakan mikropipet P200. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Selanjutnya diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga diperoleh larutan homogen histidin, kreatin dan urea 50 mg/L.

Larutan stok histidin, kreatin, dan urea 0,1 M masing-masing diambil sebanyak 64 μ L, 76 μ L, 166 μ L menggunakan mikropipet P200. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Selanjutnya diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga diperoleh larutan homogen histidin, kreatin dan urea 100 mg/L.

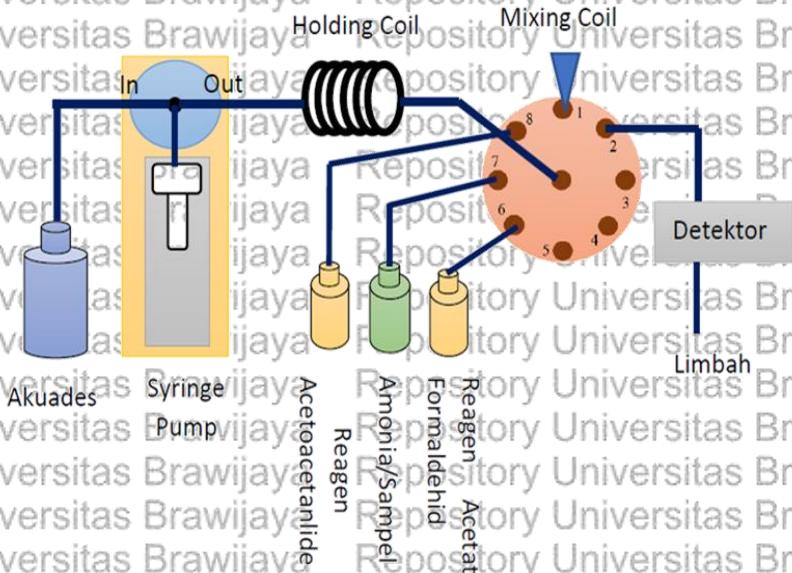
g. Pembuatan larutan standar amonia 0 – 11 mg/L

Larutan stok amonia 100 mg/L diambil sebanyak 0; 0,2; 0,6; 1; 1,4; 1,8; dan 2,2 mL menggunakan mikropipet P5000 masing-masing dipindahkan ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan diencerkan dengan akuades hingga tepat tanda batas dan dikocok hingga homogen.

3.4.2 Pendeteksian larutan amonia menggunakan alat SIA

Syringe valve diatur pada posisi *out* dan *syringe pump* mengambil 75 μ L larutan reagen asetat-formaldehid dengan laju alir 10 μ L/detik dari pos 6 menuju *holding coil*. Selanjutnya *syringe pump* mengambil 50 μ L larutan amonia dari pos 7 dengan laju alir 10 μ L/detik menuju *holding coil*. Kemudian *syringe pump* mengambil 100 μ L larutan reagen *acetoacetanilide* dengan laju alir 10 μ L/detik

dari pos 8. Pada *holding coil* akan terbentuk segmen asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide* yang selanjutnya dialirkan ke *reaction chamber* pada pos 1 untuk direaksikan dengan waktu reaksi optimum. Selanjutnya produk yang dihasilkan dari *reaction chamber* dialirkan menuju detektor melalui *line* pada pos 2 dengan laju alir optimum dan diukur absorbansinya.



Gambar 3.1 Skema sistem SIA

3.4.3 Optimasi parameter

a. Penentuan konsentrasi formaldehid optimum

Optimasi konsentrasi formaldehid pada reagen asetat-formaldehid menggunakan prosedur 3.4.2. Pada tahap ini, digunakan urutan segmentasi larutan asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide*, konsentrasi reagen *acetoacetanilide* 0,06 M dengan volume larutan 75 μL , konsentrasi amonia 10 mg/L dengan volume larutan 50 μL , volume larutan asetat-formaldehid 100 μL , waktu

reaksi 40 detik, laju alir produk ke detektor 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Konsentrasi formaldehid yang digunakan yaitu 5,10,15,20, dan 25%.

b. Penentuan perbandingan volume reagen dan sampel optimum

Optimasi perbandingan volume reagen dan sampel menggunakan prosedur 3.4.2. Pada tahap ini, digunakan urutan segmentasi larutan asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide*, konsentrasi reagen *acetoacetanilide* 0,06 M, konsentrasi amonia 10 mg/L, konsentrasi reagen asetat-formaldehid 15%, waktu reaksi 40 detik, laju alir produk ke detektor 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Perbandingan volume reagen dan sampel yang digunakan ditunjukkan pada tabel 3.1.

Tabel 3.1 Tipe perbandingan volume reagen dan sampel

Tipe	Perbandingan Volume
Asetat formaldehid : Amonia : AAA (μL)	
1	(75:100:50)
2	(100:75:50)
3	(50:100:75)
4	(100:50:75)
5	(50:75:100)
6	(75:50:100)

c. Penentuan waktu reaksi optimum

Optimasi waktu reaksi menggunakan prosedur 3.4.2. Pada tahap ini, digunakan urutan segmentasi larutan asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide*, konsentrasi reagen *acetoacetanilide* 0,06 M dengan volume larutan 100 μL , konsentrasi amonia 10 mg/L dengan volume

larutan 50 μL , konsentrasi reagen asetat-formaldehid 15% dengan volume larutan asetat-formaldehid 75 μL , waktu reaksi 40 detik, laju alir produk ke detektor 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Waktu reaksi yang digunakan yaitu 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 detik.

3.4.4 Pembuatan kurva baku

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan menggunakan alat SIA sesuai prosedur yang telah dijelaskan sebelumnya pada semua kondisi optimum. Konsentrasi amonia yang digunakan adalah 0, 1, 3, 5, 7, 9, dan 11 mg/L. Hasil absorbansi amonia yang diperoleh dari pengukuran dengan SIA di plotkan pada kurva dengan sumbu x adalah konsentrasi amonia dan sumbu y adalah absorbansi.

3.4.5 Penentuan pengaruh matriks pengganggu histidin, kreatin dan urea

Penentuan pengaruh matriks pengganggu dilakukan dengan menggunakan alat APS yang dikontrol dengan komputer. Namun, urutan segmentasi reagen dan sampel, konsentrasi reagen *acetoacetanilide*, konsentrasi reagen asetat-formaldehid, perbandingan volume reagen dan sampel, waktu reaksi dan laju alir produk ke detektor seluruhnya telah diatur pada kondisi optimum. Pada uji pengaruh matriks pengganggu ini, matriks yang digunakan terdiri dari 4 variasi perbandingan konsentrasi yaitu sebesar (1:0), (1:1), (1:5) dan (1:10). Konsentrasi larutan amonia standar yang digunakan sebesar 5 mg/L, larutan amonia tanpa penambahan matriks diukur nilai absorbansinya terlebih dahulu, kemudian dilakukan pengukuran pada larutan amonia dengan penambahan matriks dengan konsentrasi sebesar 5 mg/L, 25 mg/L dan 50 mg/L. Berdasarkan konsentrasi hasil pengukuran dapat diketahui besarnya matriks yang dapat mempengaruhi hasil serapan amonia. Selanjutnya dibandingkan dengan konsentrasi amonia tanpa adanya penambahan matriks.

3.4.6 Pengukuran LOD

Pengukuran LOD (*Limit of Detection*) dilakukan dengan cara mengukur absorbansi blanko menggunakan perangkat alat SIA dan detektor spektrofotometer UV-Vis sebanyak 10 kali ulangan, kemudian absorbansi yang dihasilkan di *plot* pada kurva baku yang telah didapatkan.

3.4.7 Preparasi sampel

Sampel limbah cair peternakan yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tiga lokasi peternakan sapi di kabupaten Malang yaitu:

1. Aliran limbah cair peternakan sapi di laboratorium lapang Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya.
2. Aliran limbah cair peternakan sapi di Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang.
3. Aliran limbah cair peternakan sapi di Kecamatan Pujon, Kabupaten Malang.

Preparasi sampel limbah cair peternakan dilakukan dengan cara pengambilan sampel pada tiga lokasi peternakan tersebut menggunakan botol HDPE yang telah dicuci bersih. Saat pengambilan sampel botol HDPE diisi penuh. Mulut botol secepatnya ditutup kembali. Kemudian pH sampel diukur dengan menggunakan pH meter untuk mengetahui pH sampel saat pengambilan sampel. Botol HDPE yang berisi sampel dimasukkan dalam *coldbox* untuk pengawetan sementara. Pada waktu selang satu jam setelah pengambilan sampel, sampel limbah cair disaring dengan menggunakan kertas saring whatman nomor 42.

3.4.8 Pengukuran kadar amonia dalam sampel dan penentuan

% recovery

Pengukuran kadar amonia dalam sampel dilakukan menggunakan alat SIA sesuai prosedur 3.4.2 dengan kondisi optimum konsentrasi formaldehid, perbandingan volume reagen dan sampel,

serta waktu reaksi. Penentuan % *recovery* dilakukan dengan cara menambahkan amonia standar 20 mg/L pada setiap sampel sebanyak 5µL kemudian diukur kembali dengan alat SIA.

3.4.9 Analisis data

a. Perhitungan persamaan korelasi linear dan koefisien korelasi

Persamaan regresi linear yang digunakan pada pembuatan kurva baku amonia sebagai berikut:

$$y = ax + b \quad (3.1)$$

y merupakan nilai absorbansi dan x merupakan konsentrasi larutan amonia yang terukur. Nilai koefisien a dan b dihitung dengan persamaan 3.2 dan 3.3 [29].

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n xi.yi}{\sum_{i=1}^n x^2} \quad (3.2)$$

$$b = \frac{n \sum_{i=1}^n xi.yi - (\sum_{i=1}^n xi)(\sum_{i=1}^n yi)}{n \sum_{i=1}^n xi^2 - (\sum_{i=1}^n xi)^2} \quad (3.3)$$

Sedangkan koefisien korelasi menggunakan persamaan 3.4:

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^n xi.yi - (\sum_{i=1}^n xi)(\sum_{i=1}^n yi)}{\sqrt{[n \sum_{i=1}^n xi^2 - (\sum_{i=1}^n xi)^2][n \sum_{i=1}^n yi^2 - (\sum_{i=1}^n yi)^2]}} \quad (3.4)$$

b. Perhitungan nilai rata-rata

Pengukuran absorbansi dilakukan beberapa kali pengulangan dan didapatkan konsentrasi pada kondisi optimum, maka nilai rata-rata konsentrasi dapat ditentukan dengan persamaan 3.5 [30].

$$\bar{x} = \frac{x1 + x2 + x3 + \dots + xn}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n xi}{n} \quad (3.5)$$

Keterangan :

\bar{x} = nilai rata-rata x_1

x_n = data pengulangan ke- n

n = banyaknya pengulangan

c. Perhitungan standar deviasi

Untuk mengetahui ketelitian dari data absorbansi larutan sampel yang diperoleh maka dilakukan perhitungan standar deviasi dan standar deviasi *relative* dengan menggunakan persamaan 3.6 dan 3.7 [30].

$$S_D = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.6)$$

$$RSD = \frac{S_D}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3.7)$$

d. Perhitungan limit deteksi

Limit deteksi (LOD) ditentukan menggunakan persamaan 3.8 [31].

$$(SA)LOD = A + 3 SD \quad (3.8)$$

Keterangan :

(SA)LOD = sinyal analit saat limit deteksi

A = absorbansi larutan blanko

SD = standar deviasi untuk larutan blanko

Hasil (SA)LOD yang diperoleh selanjutnya diplotkan pada persamaan regresi linier kurva baku antara konsentrasi sampel terhadap absorbansi sehingga didapatkan nilai LOD amonia dengan menggunakan persamaan 3.9 dan 3.10.

$$y = ax + b \quad (3.9)$$

$$(SA)LOD = a.LOD + b \quad (3.10)$$

e. Perhitungan kadar amonia

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran sampel limbah cair yang diperoleh di kawasan peternakan tanpa pengenceran. Kadar amonia dapat dihitung dengan mensubstitusikan nilai absorbansi yang terukur pada persamaan 3.11 [29].

$$y = ax + b \quad (3.11)$$

Dimana :

y = absorbansi

x = kadar amonia

f. Perhitungan % recovery

Nilai % *recovery* dalam penelitian ini, ditentukan dengan berdasarkan konsentrasi amonia dalam sampel dan konsentrasi amonia setelah penambahan larutan amonia standar, sehingga % *recovery* dapat dihitung menggunakan persamaan 3.12 [32].

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{ditambah}}}{C_{\text{sampel}}} \times 100\% \quad (3.12)$$

Keterangan:

C_{total} : konsentrasi setelah penambahan larutan standar

C_{ditambah} : konsentrasi larutan standar yang ditambahkan

C_{sampel} : konsentrasi sampel

g. Uji F (ANOVA Satu Jalur)

Menentukan jumlah kuadrat dari data dengan menggunakan persamaan 3.13 sampai 3.15 [29].

- Jumlah kuadrat tengah

$$JKT = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n X_{ij}^2 - \frac{T^2}{nk} \quad (3.13)$$

- Jumlah kuadrat kelompok

$$JKK = \sum_{i=1}^k \frac{T_i^2}{n} - \frac{T^2}{nk} \quad (3.14)$$

- Jumlah kuadrat galat

$$JKG = JKT - JKK \quad (3.15)$$

Dimana:

k : banyaknya kelompok

n : jumlah seluruh anggota sampel (pada kelompok)

Sumber Keragaman	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Tengah	F hitung
Nilai Tengah kolom	JKK	k-1	$s_1^2 = \frac{JKK}{k-1}$	$\frac{s_1^2}{s_2^2}$
Galat	JKG	k(n-1)	$s_1^2 = \frac{JKG}{k(n-1)}$	
Total	JKT	n-k		

Jika $F_{hitung} \leq F_{tabel}$

H_0 : tidak ada perbedaan yang signifikan

H_1 : terdapat perbedaan yang signifikan

h. Uji BNT

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yang berbeda dilakukan dengan uji BNT dengan persamaan 3.16 [29].

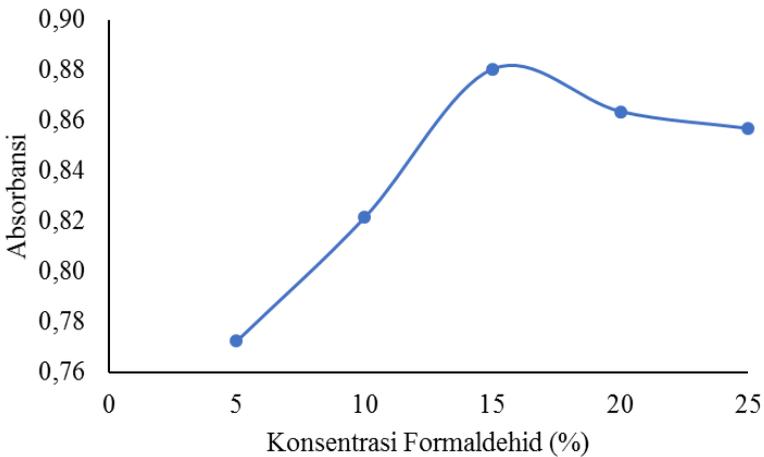
$$BNT = t_{(\alpha/2, df_{galat})} \sqrt{\frac{2KT_{galat}}{n}} \quad (3.16)$$

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Optimasi Parameter

4.1.1 Penentuan konsentrasi formaldehid optimum

Penentuan konsentrasi optimum formaldehid dilakukan untuk mengetahui konsentrasi formaldehid yang dibutuhkan untuk dapat bereaksi dengan amonia dan *acetoacetanilide* sehingga dapat membentuk produk reaksi Hantzsch yang sempurna. Pada kondisi optimum konsentrasi formaldehid dapat dilihat berdasarkan tinggi peak atau nilai absorbansi yang diperoleh, nilai absorbansi tersebut menunjukkan intensitas produk (1,4-Dihidropiridina) yang terbentuk dari reaksi Hantzsch. Konsentrasi formaldehid yang digunakan dalam reagen asetat-formaldehid yaitu 5,10,15,20 dan 25%. Hasil optimasi konsentrasi formaldehid ditunjukkan pada gambar 4.1.



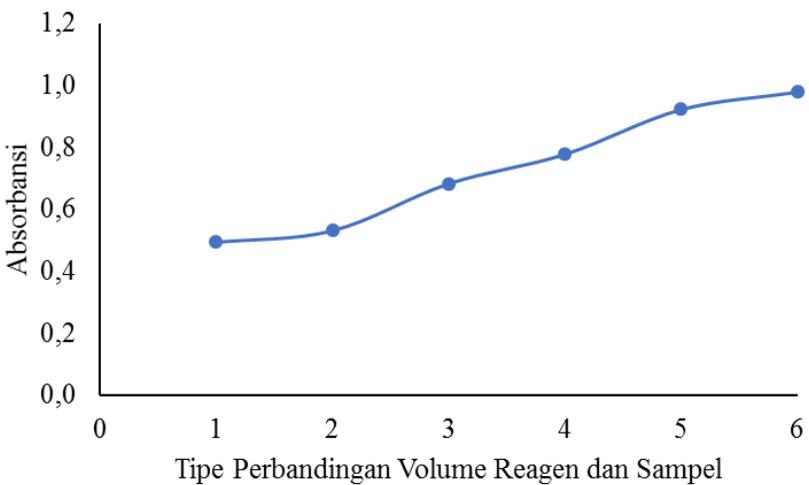
Gambar 4.1 Grafik hubungan antara konsentrasi formaldehid dengan absorbansi produk (1,4-Dihidropiridina). Kondisi: urutan segmentasi asetat formaldehid-amonia-AAA, konsentrasi *acetoacetanilide* 0,06 M, waktu reaksi 40 detik, dan laju alir menuju detektor 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$.

Berdasarkan gambar 4.1 variasi konsentrasi formaldehid yang diukur absorbansinya dengan menggunakan sistem SIA adalah 5-25 %. Hasil yang diperoleh menunjukkan absorbansi yang terukur pada berbagai konsentrasi formaldehid tersebut, diperoleh kondisi optimum pada konsentrasi formaldehid sebesar 15% dengan nilai absorbansi yang paling tinggi. Nilai absorbansi konsentrasi formaldehid meningkat pada konsentrasi 5-15%. Namun absorbansi sedikit menurun dari 20-25%. Sehingga dari hasil pengukuran tersebut, didapatkan konsentrasi formaldehid optimum yaitu sebesar 15% karena menghasilkan nilai absorbansi paling tinggi.

Berdasarkan hasil penelitian ini, konsentrasi formaldehid berbanding lurus dengan absorbansi produk pada reaksi Hantzsch hingga konsentrasi 15%. Semakin tinggi konsentrasi formaldehid maka produk yang terbentuk semakin banyak. Sehingga absorbansi mengalami peningkatan. Pada konsentrasi formaldehid sebesar 15% merupakan kondisi optimum karena pada konsentrasi tersebut telah cukup bereaksi dengan *acetoacetanilide* yang membentuk produk intermediet kedua dan akan bereaksi dengan intermediet pertama dari hasil reaksi *acetoacetanilide* dengan amonia. Sedangkan pada konsentrasi formaldehid lebih dari 15%, absorbansi tidak mengalami kenaikan lagi, dikarenakan produk reaksi Hantzsch yang terbentuk telah mencapai kesetimbangan. Menurut tabel ANNOVA pada lampiran F, menunjukkan bahwa uji F hitung lebih besar daripada F tabel sehingga perlakuan variasi konsentrasi formaldehid akan membentuk perbedaan secara signifikan. Sedangkan, pada uji BNT diperoleh nilai 0,0293 yang menandakan antara perlakuan konsentrasi formaldehid 15, 20 dan 25% tidak berbeda jauh. Namun, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi formaldehid optimum adalah konsentrasi formaldehid 15% karena memiliki absorbansi paling tinggi dan setelah konsentrasi 15% absorbansi mengalami sedikit penurunan.

4.1.2 Penentuan perbandingan volume reagen dan sampel optimum

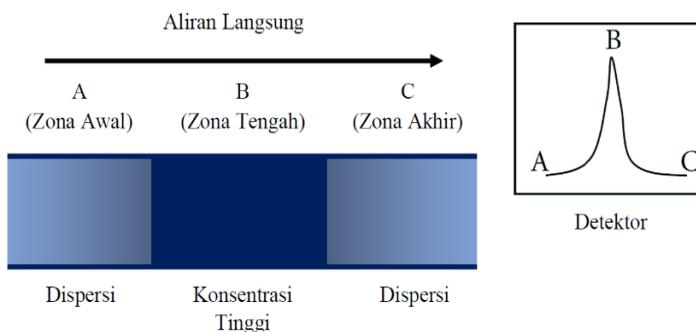
Penentuan Perbandingan volume antara reagen dan sampel pada kondisi optimum dapat diketahui dengan mengukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Optimasi perbandingan volume reagen dan sampel dilakukan agar dapat diketahui jumlah reagen dan sampel yang paling efektif dalam membentuk produk reaksi Hantzsch. Pada penentuan amonia menggunakan sistem SIA ini, digunakan tiga komponen yang akan diinjeksikan dengan urutan segmentasi berupa asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide*. Terdapat enam tipe perbandingan volume reagen dan sampel yang digunakan seperti yang ditampilkan pada tabel 3.1 untuk menginjeksikan komponen-komponen tersebut pada *mixing coil*. Hasil optimasi perbandingan volume reagen dan sampel ditunjukkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.2 Grafik hubungan antara perbandingan volume reagen dan sampel dengan absorbansi produk (1,4-Dihidropiridina). Kondisi: urutan segmentasi asetat formaldehid-amonia-AAA, konsentrasi AAA 0,06 M, konsentrasi formaldehid 15%, waktu reaksi 40 detik dan laju alir 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$.

Berdasarkan gambar 4.2 dapat diketahui bahwa perbandingan volume reagen dan sampel memberikan nilai absorbansi yang berbeda-beda. Kondisi optimum yang diperoleh ditunjukkan oleh nilai absorbansi yang tinggi yaitu pada kondisi tipe 6. Pada kondisi tipe 6 dengan perbandingan volume asetat formaldehid sebesar 75 μ L, volume amonia sebesar 50 μ L, volume *acetoacetanilide* sebesar 100 μ L.

Pada reaksi ini berdasarkan sistem alir, dalam urutan segmentasi asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide* reagen digunakan sebagai pembawa. Sampel diinjeksikan ke dalam aliran reagen, sehingga produk akan terbentuk saat reagen dan sampel mengalir bersama hingga membentuk zona produk (berupa zona senyawa *1,4-dihydro-2,6-dimethyl-N³,N⁵-diphenylpyridine-3,5-dicarboxamide*). Ketika zona produk mengalir melalui detektor, didalam zona produk terbagi mejadi tiga bagian zona yaitu zona awal dengan konsentrasi produk rendah yang masuk terlebih dahulu, diikuti zona tengah dengan konsentrasi produk yang tinggi dan zona akhir dengan konsentrasi produk yang rendah. Sinyal yang dihasilkan pada detektor menunjukkan sebagai sinyal puncak, yang merupakan titik tertinggi yang dihasilkan dari konsentrasi produk tertinggi di zona bagian tengah seperti pada gambar 4.3



Gambar 4.3 Zona produk dalam aliran *line*

Pada urutan segmentasi larutan yang digunakan, *acetoacetanilide* sejumlah 100 μ L akan terlebih dahulu kontak dengan amonia sejumlah

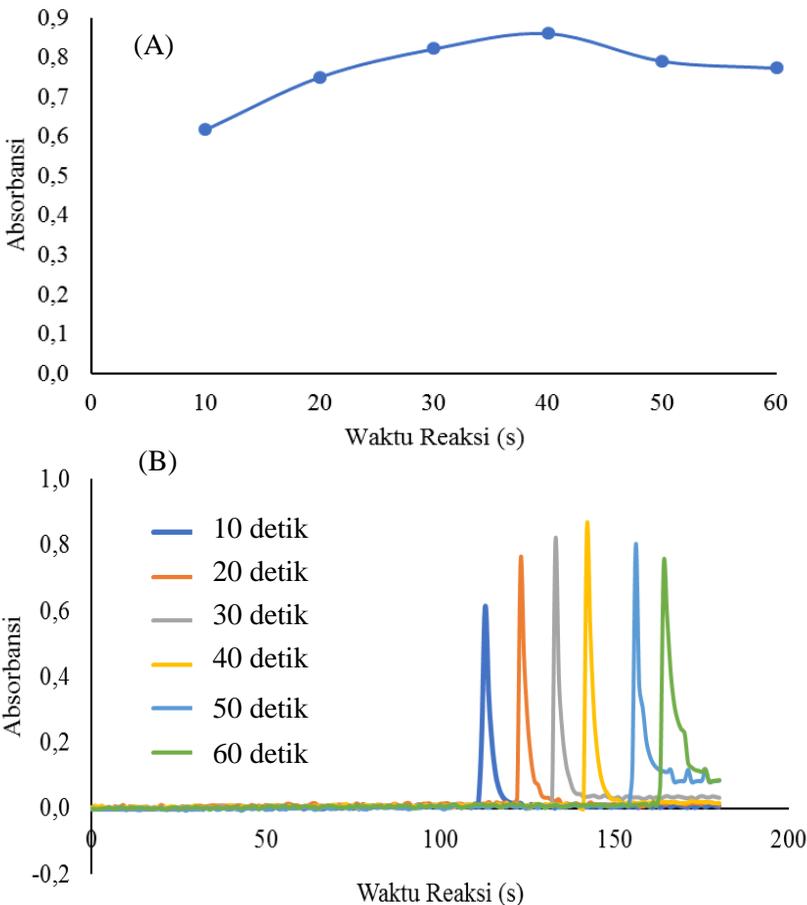
50 μL bereaksi membentuk produk intermediet pertama. Selanjutnya, *acetoacetanilide* sisanya akan kontak dengan asetat-formaldehid sejumlah 75 μL bereaksi membentuk produk intermediet kedua. Masing-masing produk intermediet tersebut akan bereaksi membentuk produk turunan dihidropiridin berupa (1,4-Dihidropiridina) yang berada di zona produk. Ketika volume reagen *acetoacetanilide* yang digunakan 100 μL , zona produk yang terbentuk cukup dan mampu membentuk produk reaksi Hantzsch dengan seluruh amonia dan asetat-formaldehid yang ada sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan tinggi dan produk yang terbentuk banyak. Apabila volume reagen *acetoacetanilide* lebih sedikit dibandingkan amonia/sampel dan reagen asetat-formaldehid, maka produk yang dihasilkan pada zona produk sedikit sehingga absorbansinya rendah. Sedangkan jika volume amonia/sampel lebih besar dibandingkan reagen *acetoacetanilide* dan asetat-formaldehid, produk yang dihasilkan pada zona produk sedikit karena reagen *acetoacetanilide* hanya kontak dan bereaksi dengan amonia/sampel, dan tidak cukup bereaksi dengan asetat-formaldehid. Jika volume asetat-formaldehid lebih besar dibandingkan reagen *acetoacetanilide* dan amonia/sampel, produk yang dihasilkan pada zona produk tidak sebanyak produk ketika volume reagen *acetoacetanilide* paling besar diantara amonia/sampel dan asetat-formaldehid karena reagen *acetoacetanilide* yang kontak dan bereaksi dengan asetat-formaldehid hanya sedikit.

4.1.3 Penentuan waktu reaksi optimum

Penentuan waktu reaksi optimum dilakukan untuk mengetahui waktu paling optimum yang dibutuhkan untuk membentuk produk reaksi Hantzsch secara sempurna. Waktu reaksi yang digunakan adalah 10-60 detik. Hasil optimasi waktu reaksi yang dilakukan ditunjukkan pada dan gambar 4.4.

Berdasarkan gambar 4.4, nilai absorbansi tertinggi ditunjukkan pada waktu reaksi 40 detik, dimana pada kondisi tersebut merupakan kondisi optimum. Pada waktu reaksi 10-40 detik, nilai absorbansi mengalami kenaikan. Pada waktu reaksi 10-40 detik me-

nunjukkan peningkatan nilai absorbansi sehingga semakin lama reaksi Hantzsch berlangsung, maka produk yang dihasilkan semakin banyak.

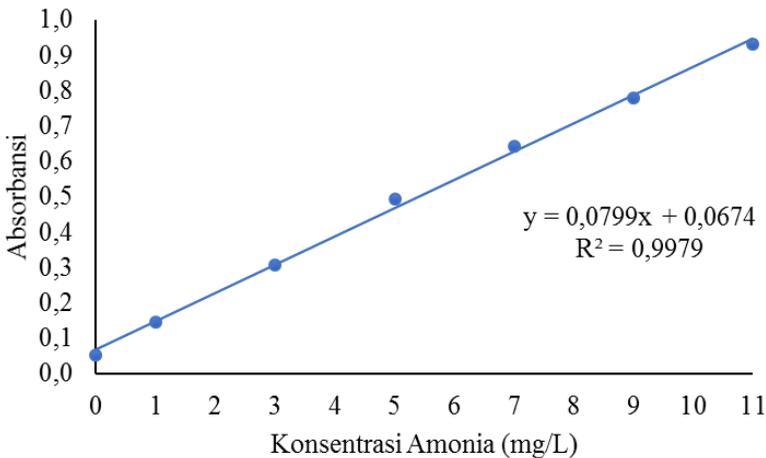


Gambar 4.2 Grafik hubungan antara waktu reaksi dengan absorbansi produk (1,4-Dihidropiridina) pada gambar (A) dan SIA-gram pada gambar (B). Kondisi: urutan segmentasi asetat formaldehid-amonia-AAA, perbandingan volume reagen dan sampel 75 μ L,50 μ L,100 μ L, konsentrasi AAA 0,06 M, konsentrasi formaldehid 15%, waktu reaksi 40 detik dan laju alir 175 μ L/detik.

Pada waktu kurang dari 40 detik yaitu 10-30 detik, reaksi Hantzsch belum berlangsung secara sempurna dalam membentuk produk dari reaksi Hantzsch. Sedangkan pada waktu 40 detik, reaksi Hantzsch berlangsung secara sempurna sehingga amonia yang ada ada dalam sampel habis bereaksi dengan larutan reagen asetat- formaldehid dan larutan reagen *acetoacetanilide*. Ketika waktu reaksi terjadi pada kondisi optimum maka reaksi Hantzsch telah mencapai kesetimbangan, sehingga tidak terjadi penambahan produk. Sehingga waktu reaksi setelah 40 detik akan konstan. Namun, pada penelitian ini pada waktu reaksi 50-60 detik terjadi penurunan nilai absorbansi. Penurunan absorbansi terjadi dikarenakan adanya dispersi (pengenceran produk reaksi Hantzsch) yang semakin besar. Hal tersebut dapat dilihat dari terbentuknya tailing pada peak yang terbentuk. Menurut tabel ANNOVA pada lampiran F, menunjukkan bahwa uji F hitung lebih besar daripada F tabel sehingga perlakuan variasi waktu reaksi akan membentuk perbedaan secara signifikan. Sedangkan untuk uji BNT diperoleh nilai 0,0202 yang menandakan antara perlakuan konsentrasi formaldehid 30, 40, 50 dan 60 detik masih tergolong berbeda jauh, maka dapat disimpulkan bahwa waktu reaksi optimum adalah 40 detik.

4.2 Pembuatan kurva baku

Pembuatan kurva baku dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi yang berasal dari produk reaksi Hantzsch dengan konsentrasi amonia sebesar 0-11 mg/L. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan seluruh kondisi optimum parameter yang telah dilakukan meliputi konsentrasi formaldehid sebesar 15%, perbandingan volume reagen dan sampel (asetat formaldehid : amonia : AAA) sebesar 75 μ L:50 μ L:100 μ L, dan waktu reaksi sebesar 40 detik. Hasil pengukuran dari kurva baku ditunjukkan pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 Kurva baku penentuan amonia berdasarkan reaksi Hantzsch menggunakan metode SIA

Berdasarkan kurva baku yang diperoleh seperti pada gambar 4.5 persamaan korelasi linier yang diperoleh adalah $\hat{y} = 0,0799x + 0,0674$ dengan nilai koefisien relasi (R) sebesar 0,9979, dimana y adalah nilai dari absorbansi dan x adalah nilai dari konsentrasi amonia yang diperoleh. Hasil koefisien korelasi yang didapatkan sebesar 0,9979 menunjukkan nilai kuatnya hubungan korelasi antara absorbansi dengan konsentrasi amonia. Selanjutnya, persamaan kurva baku digunakan untuk menghitung kadar amonia yang ada di dalam sampel serta penentuan limit deteksi. Limit deteksi ditentukan dengan pengukuran larutan blanko ($n=10$). Hasil pengukuran yang diperoleh selanjutnya dihitung berdasarkan kurva baku, sehingga diperoleh limit deteksi sebesar 0,044 mg/L.

4.1 Uji pengaruh matriks pengganggu

Uji pengaruh matriks pengganggu dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh matriks pengganggu dalam pengukuran amonia. Dalam limbah cair peternakan sapi tidak hanya mengandung

amonia, tetapi juga mengandung unsur nitrogen total dan phosphor. Unsur nitrogen total mengandung beberapa unsur yang dimungkinkan dapat mengganggu dalam pengukuran amonia. Pada penelitian ini, matriks pengganggu yang digunakan berupa histidin, kreatin dan urea.

Untuk mengetahui pengaruh matriks pengganggu tersebut dilakukan pengukuran terhadap larutan amonia standar dengan penambahan berbagai variasi konsentrasi matriks pengganggu. Konsentrasi amonia standar yang digunakan sebesar 5 mg/L, sedangkan konsentrasi matriks pengganggu yang digunakan sebesar 0, 5, 25 dan 50 mg/L pada masing-masing matriks pengganggu yang digunakan. Data pengukuran pengaruh matriks ditunjukkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data pengukuran konsentrasi amonia dengan penambahan matriks pengganggu

Komponen	Konsentrasi Matriks Pengganggu (mg/L)	Konsentrasi Amonia Standar (mg/L)	Konsentrasi Amonia Setelah Penambahan (mg/L) (*)	% Kesalahan
Histidin	0	5	$5,25 \pm 0,06$	-
	5		$5,04 \pm 0,09$	3,89
	25		$5,06 \pm 0,06$	3,55
	50		$5,10 \pm 0,02$	2,76
Kreatin	0	5	$5,25 \pm 0,06$	-
	5		$5,01 \pm 0,06$	4,56
	25		$5,12 \pm 0,01$	2,43
	50		$5,25 \pm 0,01$	0,07
Urea	0	5	$5,25 \pm 0,06$	-
	5		$5,04 \pm 0,07$	3,92
	25		$5,19 \pm 0,05$	1,16
	50		$5,34 \pm 0,06$	1,65

(*): rata-rata dari 3 kali pengulangan (n=3)

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh matriks pengganggu berupa histidin, kreatin dan urea terhadap pengukuran amonia diketahui bahwa dengan adanya variasi penambahan konsentrasi matriks tidak memberikan pengaruh yang terhadap nilai absorbansi yang dihasilkan. Dari nilai % kesalahan yang diperoleh dari masing-masing matriks pengganggu tidak melebihi dari $\pm 5\%$ sehingga tidak memberikan pengaruh pada pengukuran amonia hingga konsentrasi matriks pengganggu sebesar 50 mg/L.

4.4 Pengukuran amonia pada sampel

Pada penelitian ini, pengukuran kadar amonia pada sampel yang berasal dari limbah cair peternakan, sampel tersebut berasal dari tiga Kawasan peternakan di Kabupaten Malang, yaitu sampel 1 berasal dari aliran limbah laboratorium lapang Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, sampel 2 berasal dari aliran limbah peternakan warga di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang, dan sampel 3 berasal dari aliran limbah peternakan warga di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang. Pada pengukuran amonia di dalam sampel, menggunakan metode SIA. Hasil pengukuran kadar amonia pada sampel ditunjukkan pada tabel 4.2.

Absorbansi sampel pada pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang diperoleh disubstitusikan ke dalam persamaan kurva baku $y = 0,0799x + 0,0674$ dengan nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9979. Berdasarkan tabel 4.2 diketahui bahwa kadar amonia yang ada di dalam tiga sampel limbah cair peternakan dari tiga lokasi sampling memiliki kadar amonia di bawah ambang batas yang masih diperbolehkan berdasarkan Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 5 Tahun 2014 tentang baku mutu air limbah peternakan. Kadar amonia pada sampel 1 sebesar 8,39 mg/L, pada sampel 2 sebesar 8,04 mg/L, dan pada sampel 3 sebesar 8,43 mg/L. Setelah dilakukan pengukuran kadar amonia di dalam sampel, selanjutnya dilakukan uji *recovery* untuk mengetahui keakuratan data yang telah diperoleh dari pengukuran yang dilakukan. Pengukuran % *recovery* dilakukan dengan menambahkan larutan standar amonia 20

mg/L sebanyak 5 μ L ke dalam masing-masing sampel yang telah diukur sebelumnya. Sehingga dapat diketahui perbedaan antara konsentrasi sebelum dan setelah penambahan amonia standar. Hasil pengukuran uji *recovery* ditunjukkan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pengukuran amonia pada sampel

Sampel	Konsentrasi amonia ditambahkan (mg/L)	Konsentrasi amonia diperoleh (mg/L)(*)	% <i>Recovery</i>
1	0,00	$8,39 \pm 0,25$	
	2,00	$9,58 \pm 0,29$	90,30
2	0,00	$8,04 \pm 0,27$	
	2,00	$9,41 \pm 0,22$	91,58
3	0,00	$8,43 \pm 0,23$	
	2,00	$10,03 \pm 0,26$	95,25

(*): rata-rata dari 3 kali pengulangan (n=3)

Berdasarkan tabel 4.2 diatas, hasilnya menunjukkan bahwa masing-masing uji *recovery* dari sampel memiliki nilai % *recovery* yang tinggi. Pada sampel 1 nilai % *recovery* sebesar 90,30 %, pada sampel 2 nilai % *recovery* sebesar 91,58 % dan pada sampel 3 nilai % *recovery* sebesar 95,25 %. Dari hasil uji % *recovery* tersebut, memenuhi syarat akurasi dengan rentang 80-115% sehingga pengukuran kadar amonia menggunakan metode SIA dengan reagen *acetoacetanilide* dapat direkomendasikan dalam penentuan kadar amonia.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kondisi optimum pengukuran kadar amonia menggunakan metode SIA berdasarkan reaksi Hantzsch yaitu konsentrasi formaldehid 15 %, perbandingan volume reagen dan sampel pada urutan segmen asetat formaldehid – amonia – *acetoacetanilide* sebesar 75 μL : 50 μL : 100 μL , serta waktu reaksi 40 detik.
2. Matriks pengganggu berupa histidin, kreatin dan urea tidak memberikan pengaruh hingga pada konsentrasi matriks pengganggu 50 mg/L pada pengukuran amonia menggunakan Metode SIA berdasarkan reaksi Hantzsch dengan reagen *acetoacetanilide*.
3. Pengukuran kadar amonia dengan menggunakan metode Sequential Injection Analysis (SIA) berdasarkan reaksi Hantzsch dengan reagen *acetoacetanilide* dapat diaplikasikan pada limbah cair di kawasan peternakan sapi dengan nilai validitas tinggi yang didasarkan pada limit deteksi yang rendah yaitu sebesar 0,044 mg/L dan nilai % *recovery* sebesar > 90,30 % yang memenuhi syarat akurasi dengan rentang 80-115%.

5.2 Saran

Pada penelitian ini, terdapat kekurangan yaitu nilai sensitivitas dan akurasinya masih rendah. Sehingga untuk meningkatkan sensitivitas dan akurasinya perlu dilakukan penggunaan reagen lain yang lebih *sensitive* seperti turunan *acetoacetanilide* meliputi *methylacetoacetanilide*, *methoxyacetoacetanilide*, *chloroacetoacetanilide*, *acetoacetyl amino acid*, *ethoxyacetoacetanilide*, dalam pengukuran amonia menggunakan reaksi Hantzsch.

DAFTAR PUSTAKA

1. I Gusti Ketut Puja, FA. R. S. (2012, 17 Oktober). Studi Eksperimental Pendingin Adsorpsi Amonia-CaCl₂ Energi Surya Experimental Study Of Solar Energy Ammonia-CaCl₂ Adsorbtion Refrigeration. Proceeding Seminar Nasional Tahunan Teknik Mesin XI (SNTTM XI) & Thermofluid IV.
2. Riza, H., Wizna, W., & Rizal, Y. (2015). Peran Probiotik dalam Menurunkan Amonia Feses Unggas. *Jurnal Peternakan Indonesia (Indonesian Journal of Animal Science)*, 17(1), 19. doi:10.25077/jpi.17.1.19-26.2015
3. Cramer, C. O., Converse, G. H., Tenpas, & Schlough, D. A. (1971). The Design of Solid Manure Storage for Dairy Herds. *American Society of Agricultural Engineers*, 71–910.
4. Bristow, A. W., Whitehead, D. C., & Cockburn, J. E. (1992). Nitrogenous constituents in the urine of cattle, sheep and goats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59(3), 387–394. doi:10.1002/jsfa.2740590316
5. Menteri Lingkungan Hidup. (2014). Baku Mutu Air Limbah Industri Peternakan dalam Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Republik Indonesia tentang Baku Mutu Air Limbah.
6. Widyastuti, F. R. (2013). Upaya Pengelolaan Lingkungan Usaha Peternakan Sapi di Kawasan Usahatani Terpadu Bangka Botanical Garden Pangkalpinang, *Prosiding Seminar Nasional Pengelolaan Sumber Daya Alam dan Lingkungan 2013*, 5.
7. Salamah, U., & Andriyani, R. (2018). Risk Analysis of Health Workers in Slaughterhouses Due to Ammonia Gas Exposure. *Jurnal Kesehatan Lingkungan*, 10(1), 25. doi:10.20473/jkl.v10i1.2018.25-35
8. Hasri, H., & Mudasir, M. (2010). Studi Pengaruh Penambahan Etanol dan Pemanasan pada Penentuan Amonia dalam Air

- dengan Metode Indofenol Biru. *Indonesian Journal of Chemistry*, 2(2), 97–101. doi:10.22146/ijc.21920
9. Pujiastuti, C. (2008). Kajian Penurunan Ca dan Mg dalam Air Laut Menggunakan Resin (DOWEX). *Jurnal Teknik Kimia*, 3(1), 8
 10. Klein, S. (2002). Measurement of Ammonium by Ion Chromatography In High Sodium Concentration. *The Journal of Undergraduate Research*, 4, 74–85.
 11. Liu, R. (1997). Reversed flow injection spectrophotometric determination of trace amount of ammonia in natural water by oxidation of ammonia to nitrite. *Talanta*, 45(2), 405–410. doi:10.1016/S0039-9140(97)00148-3
 12. Liang, Y., Yan, C., Guo, Q., Xu, J., & Hu, H. (2016). Spectrophotometric determination of ammonia nitrogen in water by flow injection analysis based on NH₃- o-phthalaldehyde - Na₂SO₃ reaction. *Analytical Chemistry Research*, 10, 1–8. doi:10.1016/j.ancr.2016.10.001
 13. Ruzicka, J., & Marshall, G. D. (1990). Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, 237, 329–343. doi:10.1016/S0003-2670(00)83937-9
 14. Giakisikli, G., Trikas, E., Petala, M., Karapantsios, T., Zachariadis, G., & Anthemidis, A. (2017). An integrated sequential injection analysis system for ammoniumdetermination in recycled hygiene and potable water samples for future use in manned space missions. *Microchemical Journal*, 133, 490–495. doi:10.1016/j.microc.2017.04.008
 15. Sardesai, V. M., & Provido, H. S. (1969). A fluorometric procedure for the determination of ammonia in blood.

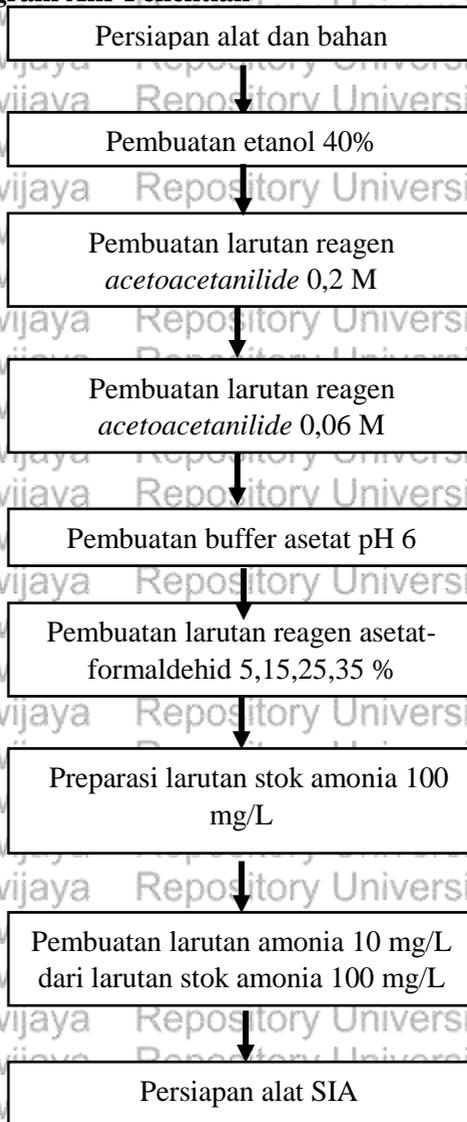
- Microchemical Journal*, 14(4), 550–555. doi:10.1016/0026-265x(69)90091-5
16. Nash, T. (1953). The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal*, 55(3), 416–421. doi:10.1042/bj0550416
 17. Li, Q., Sritharathikhun, P., & Motomizu, S. (2007). Development of novel reagent for Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and fluorometry. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 23(4), 413–417.
 18. Menteri Lingkungan HidupAsaad. (2009). Baku Mutu Air Limbah Bagi Usaha dan/atau Kegiatan Peternakan Sapi dan Babi, 1.
 19. Hasri. (2001). *Studi pengaruh penambahan etanol atau aseton dan pemanasan pada penentuan amonia dengan metode indofenol*. Universitas Gadjah Mada. Retrieved from http://etd.repository.ugm.ac.id/index.php?mod=penelitian_detail&sub=PenelitianDetail&act=view&typ=html&buku_id=7410
 20. Murti, R. S., & Purwanti, C. M. H. (2014). Optimasi waktu reaksi pembentukan kompleks indofenol biru stabil pada uji n-amonia air limbah industri penyamakan kulit dengan metode fenat. *Majalah Kulit, Karet, dan Plastik*, 30(1), 29. doi:10.20543/mkpp.v30i1.121
 21. Economou, A., Tzanavaras, P. D., & Themelis, D. G. (2005). Sequential-Injection Analysis: Principles, Instrument Construction, and Demonstration by a Simple Experiment. *Journal of Chemical Education*, 82(12), 1820. doi:10.1021/ed082p1820
 22. Pimenta, A. M., Montenegro, M. C. B. S. M., Araújo, A. N., & Calatayud, J. M. (2006). Application of sequential injection

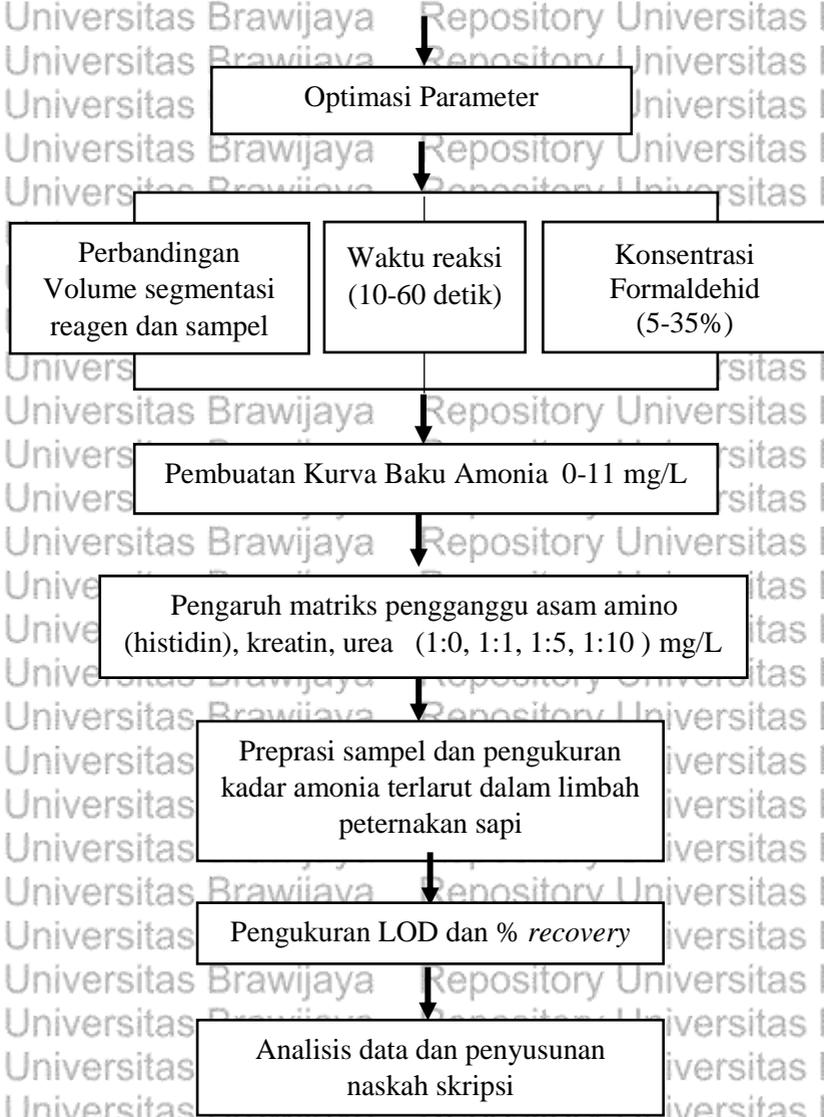
- analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40(1), 16–34.
doi:10.1016/j.jpba.2005.10.006
23. Economou, A., & Nika, M. (2006). A Fully Automated Sequential-Injection Analyser for Dual Electrogenerated Chemiluminescence/Amperometric Detection. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2006, 1–9.
doi:10.1155/JAMMC/2006/67571
 24. Vijayan, N., Ramesh Babu, R., Gopalakrishnan, R., & Ramasamy, P. (2004). Some studies on the growth and characterization of organic nonlinear optical acetoacetanilide single crystals. *Journal of Crystal Growth*, 267(3–4), 646–653.
doi:10.1016/j.jcrysgro.2004.04.008
 25. Li, Q., Sritharathikhum, P., Oshima, M., & Motomizu, S. (2008, April). Development of novel detection reagent for simple and sensitive determination of trace amounts of formaldehyde and its application to flow injection spectrophotometric analysis. *Analytica Chimica Acta*. doi:10.1016/j.aca.2008.02.028
 26. Rutuja S Shah, R. R. S., & Rajashri B Pawar, P. P. G. (2015). UV-Visible Spectroscopy. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 5(5).
 27. Adeeyinwo, C.E., O., N. N., & Idowu, G. O. (2013). Basic Calibration of UV/ Visible Spectrophotometer. *International Journal of Science and Technology*, 2(3).
 28. Octaviani, T., Guntarti, A., & Susanti, H. (n.d.). Determination of β -Carotene In Some Types of Chili (Genus *Capsium*) Using Visible Spectrophotometry Method. *Pharmaciana*, 4(2), 9.
 29. J.C. Miller, J. N. M. (1991). *Statistika Untuk Kimia Analitik*. Bandung: ITB.

30. R.A. Day, A. L. U. (2002). *Analisis Kuantitatif/Edisi Keenam*. Jakarta: Erlangga.
31. Torowati, B. S. G. (2014). Penentuan Limit Deteksi dan Kuantitasi Alat Titrasi Potensiometri Untuk Analisis Uranium. *Pusat Teknologi Bahan Bakar Nuklir Kawasan Puspptek*, (13).
32. Horwitz, W. (2002). *AOAC Guidelines for Single Laboratory*. Arlington, 38.

LAMPIRAN

Lampiran A. Diagram Alir Penelitian





Lampiran B. Preparasi Larutan Sekunder

B.1 Pembuatan larutan stok AAA 0,2 M

Padatan *acetacetanilide* ditimbang sebanyak 3,544 g dan dilarutkan dengan 50 mL etanol absolut (95%) dalam gelas beaker 250 mL. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar 100 mL, diencerkan dengan akuades hingga tepat tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

B.2 Pembuatan etanol 40%

Etanol 95% diambil sebanyak 42 mL dengan menggunakan pipet ukur 10 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

B.3 Pembuatan asam asetat 1 M

Asam asetat absolut (100%) diambil sebanyak 0,572 mL menggunakan mikro pipet P1000 dan dimasukkan dalam labu takar 10 mL, kemudian diencerkan dengan akuades hingga tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

B.4 Pembuatan larutan natrium Asetat 1 M

Padatan natrium asetat ditimbang sebanyak 8,203 g dan dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas beaker 250 mL. Larutan dipindahkan dalam labu takar 100 mL, diencerkan dengan akuades hingga tepat tanda batas, dan dikocok hingga homogen.

B.5 Pembuatan larutan buffer asetat pH 6

Larutan asam asetat 1 M diambil sebanyak 5,4 mL menggunakan pipet mikro P5000 dan dimasukkan dalam gelas beaker 250 mL. Larutan natrium asetat 1 M ditambahkan sebanyak 94,6 mL ke dalam gelas beaker 250 mL yang berisi asam asetat 1 M, larutan diaduk dan diukur pHnya menggunakan pH meter.

Lampiran C. Preparasi Alat SIA

C.1 Perangkaian alat SIA

Komponen-komponen alat SIA dihubungkan satu sama lain, yaitu *syringe pump*, *holding coil*, *multi-position valve*, dan pipa kapiler pada masing-masing valve pos. Selanjutnya, seperangkat alat SIA dihubungkan dengan detektor spektrofotometer UV-Visible. *Flow-cell* dimasukkan dalam *sample compartment* spektrofotometer UV-Visible. Kemudian, pipa kapiler pada pos 2 dihubungkan dengan salah satu pipa kapiler yang berada pada *flow-cell*. Sementara itu, satu pipa kapiler lain pada *flow-cell* dihubungkan dengan pipa kapiler untuk aliran limbah. Tahap selanjutnya, seperangkat alat SIA maupun detektor spektrofotometer UV-Visible dihubungkan dengan sumber listrik.

C.2 Pencucian pipa kapiler (*Line*)

Semua pipa kapiler dan detektor dicuci menggunakan akuades dengan cara *syringe valve* diatur pada posisi *in* dan *syringe pump* mengambil sebanyak 2500 μL akuades dengan kecepatan 100 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Selanjutnya *syringe valve* diubah pada posisi *out* dan *syringe valve* akan mengalirkan akuades pada *holding coil* yang selanjutnya dialirkan menuju *selection valve* pada masing-masing pos. Akuades yang dialirkan menuju *reaction chamber* di pos 1 dan line 3,4,5,6, 7 dan 8 sebanyak 500 μL dengan laju alir 100 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Sisa akuades dialirkan menuju pos 2 yaitu detektor dengan laju alir 100 $\mu\text{L}/\text{detik}$.

C.3 Pengisian *line*

Setiap *line* pada masing-masing pos dialiri dengan larutan amonia (sampel atau standar), *reagent solution acetoacetanilide*, dan reagen asetat-formaldehid. *Syringe valve* diatur pada posisi *out* dan *syringe pump* mengambil 75 μL reagen asetat-formaldehid pada pos 6 dengan laju alir 10 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Kemudian *syringe pump* mengambil 50 μL larutan amonia untuk mengisi *line* pada pos 7 dengan laju alir 10 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Selanjutnya *syringe pump* mengambil 100 μL larutan

reagen *acetoacetanilide* untuk mengisi *line* pada pos 8 dengan laju alir 10 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Pada *holding coil* akan terbentuk segmen asetat formaldehid-amonia-*acetoacetanilide* yang selanjutnya dialirkan ke *reaction chamber* pada pos 1 untuk direaksikan dengan waktu reaksi 5 detik. Selanjutnya produk yang dihasilkan pada *reaction chamber* dialirkan menuju detektor melalui *line* pada pos 2 dengan laju alir 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$.

Lampiran D. Perhitungan Preparasi Larutan

D.1 Perhitungan pembuatan etanol 40%

Etanol 40% dibuat dengan mengencerkan etanol 95% dengan akuades hingga volume 100 mL :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$95\% \times V_1 = 40\% \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = (40\% \times 100 \text{ mL}) / 95\%$$

$$V_1 = 42 \text{ mL}$$

Jadi, etanol 95% yang dibutuhkan untuk membuat etanol 40% sebesar 42 mL.

D.2 Perhitungan pembuatan larutan AAA 0,2 M

Acetoacetanilide 0,2 M dibuat dengan melarutkan padatan *acetoacetanilide* dengan menggunakan etanol 95% dan akuades (perbandingan 1:2) hingga volume 100 mL :

$$0,2 \text{ M} = \frac{m}{Mr} \times \frac{1000}{V \text{ (mL)}}$$

$$0,2 \text{ M} = \frac{m}{177,2 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{100 \text{ mL}}$$

$$m = \frac{0,2 \text{ M} \times 177,2 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 10 \text{ mL}}{1000}$$

$$m = 3,544 \text{ g}$$

Jadi, padatan *acetoacetanilide* yang digunakan untuk membuat *acetoacetanilide* 0,2 M sebesar 3,544 g.

D.3 Perhitungan pembuatan larutan reagen AAA 0,06 M

Larutan reagen *acetoacetanilide* 0,06 M dibuat dengan mengencerkan larutan *acetoacetanilide* 0,2 M menggunakan etanol 40% hingga volume 50 mL:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$0,2 \text{ M} \times V_1 = 0,06 \text{ M} \times 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = (0,06 \text{ M} \times 100 \text{ mL}) / 0,2 \text{ M}$$

$$V_1 = 15 \text{ mL}$$

Jadi, larutan *acetoacetanilide* 0,2 M yang dibutuhkan untuk membuat larutan reagent solution *acetoacetanilide* 0,06 M sebesar 15 mL.

D.4 Perhitungan pembuatan asam asetat 1 M

Larutan asam asetat 1 M dibuat dengan mengencerkan asam asetat absolut (100%) dengan akuades hingga volume 10 mL:

$$[\text{Asam asetat 100\%}] = \frac{\rho \times 10 \times \text{kadar}}{Mr}$$

$$= \frac{1,05 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \times 100}{60,05}$$

$$= 17,48 \text{ M}$$

Pengenceran dari 17,48 M menjadi 1 M :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$17,48 \text{ M} \times V_1 = 1 \text{ M} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (1 \text{ M} \times 10 \text{ mL}) \div 17,48 \text{ M}$$

$$V_1 = 0,572 \text{ mL}$$

$$V_1 = 572 \mu\text{L}$$

Jadi, asam asetat yang digunakan untuk membuat larutan asam asetat 1 M sebesar 572 μL .

D.5 Perhitungan pembuatan natrium asetat 1 M

Larutan natrium asetat 1 M dibuat dari padatan natrium asetat yang dilarutkan dengan menggunakan akuades hingga 100 mL:

$$1 \text{ M} = \frac{m}{Mr} \times \frac{1000}{V \text{ (mL)}}$$

$$1 \text{ M} = \frac{m}{82,03 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{100 \text{ mL}}$$

$$m = \frac{1,67 \text{ M} \times 82,03 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 100 \text{ mL}}{1000}$$

$$m = 8,203 \text{ g}$$

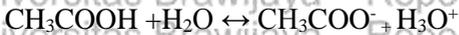
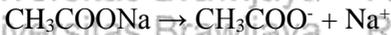
Jadi, padatan natrium asetat yang digunakan untuk membuat larutan natrium asetat 1 M sebesar 8,203 g.

D.6 Perhitungan pembuatan larutan buffer asetat pH 6

Diket : $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 1 \text{ M}$

$[\text{CH}_3\text{COONa}] = 1 \text{ M}$

Volume total pencampuran larutan buffer asetat = 100 mL



$$\text{pH} = \text{pKa} - \log \frac{[\text{asam lemah}]}{[\text{garam}]}$$

$$[\text{H}^+] = \text{Ka} \frac{[\text{asam lemah}]}{[\text{garam}]}$$

$$[\text{H}^+] = \text{Ka} \frac{[\text{CH}_3\text{COO}^-]}{[\text{CH}_3\text{COONa}]}$$

$$[\text{H}^+] = \text{Ka} \frac{\left[\frac{\text{mol CH}_3\text{COO}^-}{\text{volume total}} \right]}{\left[\frac{\text{mol CH}_3\text{COONa}}{\text{volume total}} \right]}$$

$$10^{-6} = 1,75 \times 10^{-5} \frac{\frac{100 \text{ mL}}{1(100-x)}}{100 \text{ mL}}$$

$$\frac{10^{-6}}{1,75 \times 10^{-5}} = \frac{\frac{100 \text{ mL}}{1(100-x)}}{100 \text{ mL}}$$

$$0,0571 = \frac{100 \text{ mL}}{1(100-x)}$$

$$0,0571(100-x) = x$$

$$5,71 - 0,0571x = x$$

$$5,71 = 1,0571x$$

$$\frac{5,71}{1,0571} = x$$

$$5,4 = x$$

Volume asam asetat yang ditambahkan = $x = 5,4 \text{ mL}$

Volume natrium asetat yang ditambahkan = $100-x$

$$= 100 \text{ mL} - 5,4 \text{ mL}$$

$$= 94,6 \text{ mL}$$

D.7 Perhitungan pembuatan variasi konsentrasi asetat-

formaldehid 5%-25%

Variasi konsentrasi formaldehid 5%-25% dibuat dengan mengencerkan formaldehid 40% dengan menggunakan larutan buffer asetat pH 6 hingga volume 10 mL :

Pembuatan formaldehid 5%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$40\% \times V_1 = 5\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ mL}$$

Pembuatan formaldehid 10%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$40\% \times V_1 = 10\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

Pembuatan formaldehid 15%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$40\% \times V_1 = 15\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,75 \text{ mL}$$

Pembuatan formaldehid 20%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$40\% \times V_1 = 20\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Pembuatan formaldehid 25%

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$40\% \times V_1 = 25\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 6,25 \text{ mL}$$

Jadi, volume formaldehid 40% yang digunakan untuk membuat variasi konsentrasi formaldehid adalah sebagai berikut :

Tabel L.D.1 Pembuatan larutan reagen asetat-formaldehid

[Formaldehid] (%)	Volume Formaldehid 40% (mL)
5	1,25
10	2,5
15	3,75
20	5
25	6,25

D.8 Perhitungan Pembuatan Larutan Stok Histidin 0,1 M

Larutan stok histidin 0,1 M dibuat dari padatan histidin yang dilarutkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

$$0,1 \text{ M} = \frac{m}{Mr} \times \frac{1000}{V \text{ (mL)}}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{m}{155,16 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{10 \text{ mL}}$$

$$m = \frac{0,1 \text{ M} \times 155,16 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 10 \text{ mL}}{1000}$$

$$m = 0,155 \text{ g}$$

Jadi, padatan histidin yang digunakan untuk membuat larutan stok histidin 0,1 M sebesar 0,155 g

D.9 Perhitungan pembuatan larutan stok histidin 100 mg/L

Larutan stok histidin 100 mg/L dibuat dari larutan histidin 0,1 M yang diencerkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

Konversi dari M ke mg/L :

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$\rightarrow 0,1 \text{ mol} = m/Mr$$

$$\rightarrow m = 0,1 \text{ mol} \times 155,16 \text{ g/mol}$$

$$\rightarrow m = 15,516 \text{ g}$$

$$\rightarrow m = 15.516 \text{ mg}$$

$$0,1 \text{ M} = 15.516 \text{ mg/L}$$

Pengenceran dari 15.516 mg/L menjadi 100 mg/L:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$15.516 \text{ mg/L} \times V_1 = 100 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (100 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}) / 15.516 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,064 \text{ mL}$$

$$V_1 = 64 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan histidin 0,1 M yang digunakan untuk membuat larutan stok histidin 100 mg/L sebesar 64 μL .

D.10 Perhitungan pembuatan larutan stok histidin 50 mg/L

Larutan stok histidin 50 mg/L dibuat dari larutan histidin 0,1 M yang diencerkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

Konversi dari M ke mg/L :

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$\text{➤ } 0,1 \text{ mol} = m/\text{Mr}$$

$$\text{➤ } m = 0,1 \text{ mol} \times 155,16 \text{ g/mol}$$

$$\text{➤ } m = 15,516 \text{ g}$$

$$\text{➤ } m = 15.516 \text{ mg}$$

$$0,1 \text{ M} = 15.516 \text{ mg/L}$$

Pengenceran dari 15.516 mg/L menjadi 50 mg/L:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$15.516 \text{ mg/L} \times V_1 = 50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}) / 15.516 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,032 \text{ mL}$$

$$V_1 = 32 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan histidin 0,1 M yang digunakan untuk membuat larutan stok histidin 50 mg/L sebesar 32 μL .

D.11 Perhitungan pembuatan larutan stok kreatin 0,1 M

Larutan stok kreatin 0,1 M dibuat dari padatan kreatin yang dilarutkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

$$0,1 \text{ M} = \frac{m}{Mr} \times \frac{1000}{V \text{ (mL)}}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{m}{131,14 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{10 \text{ mL}}$$

$$m = \frac{0,1 \text{ M} \times 131,14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 10 \text{ mL}}{1000}$$

$$m = 0,131 \text{ g}$$

Jadi, padatan kreatin yang digunakan untuk membuat larutan kreatin 0,1 M sebesar 0,131 g.

D.12 Perhitungan pembuatan larutan stok kreatin 100 mg/L

Larutan stok kreatin 100 mg/L dibuat dari larutan kreatin 0,1 M yang diencerkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

Konversi dari M ke mg/L :

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$0,1 \text{ mol} = m/Mr$$

$$\rightarrow m = 0,1 \text{ mol} \times 131,14 \text{ g/mol}$$

$$\rightarrow m = 13,114 \text{ g}$$

$$\rightarrow m = 13,114 \text{ mg}$$

$$0,1 \text{ M} = 13,114 \text{ mg/L}$$

Pengenceran dari 13.114 mg/L menjadi 100 mg/L :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$13,114 \text{ mg/L} \times V_1 = 100 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (100 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}) / 13,114 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,076 \text{ mL}$$

$$V_1 = 76 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan kreatin 0,1 M yang digunakan untuk membuat larutan stok kreatin 100 mg/L sebesar 76 μL .

D.13 Perhitungan pembuatan larutan stok kreatin 50 mg/L

Larutan stok kreatin 50 mg/L dibuat dari larutan kreatin 0,1 M yang diencerkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

Konversi dari M ke mg/L :

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$\begin{aligned} &\text{➤ } 0,1 \text{ mol} = m/Mr \\ &\text{➤ } m = 0,1 \text{ mol} \times 131,14 \text{ g/mol} \\ &\text{➤ } m = 13,114 \text{ g} \\ &\text{➤ } m = 13.114 \text{ mg} \\ 0,1 \text{ M} &= 13.114 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

Pengenceran dari 13.114 mg/L menjadi 50 mg/L :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$13.114 \text{ mg/L} \times V_1 = 50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}) / 13.114 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,038 \text{ mL}$$

$$V_1 = 38 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan kreatin 0,1 M yang digunakan untuk membuat larutan stok kreatin 50 mg/L sebesar 38 μL .

D.14 Perhitungan pembuatan larutan stok urea 0,1 M

Larutan stok urea 0,1 M dibuat dari padatan urea yang dilarutkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

$$0,1 \text{ M} = \frac{m}{Mr} \times \frac{1000}{V \text{ (mL)}}$$

$$0,1 \text{ M} = \frac{m}{60,06 \text{ g/mol}} \times \frac{1000}{10 \text{ mL}}$$

$$m = \frac{0,1 \text{ M} \times 60,06 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 10 \text{ mL}}{1000}$$

$$m = 0,06 \text{ g}$$

Jadi, padatan urea yang digunakan untuk membuat larutan stok urea 0,1 M sebesar 0,06 g.

D.15 Perhitungan pembuatan larutan stok urea 100 mg/L

Larutan stok urea 100 mg/L dibuat dari larutan urea 0,1 M yang diencerkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

Konversi dari M ke mg/L :

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$\text{➤ } 0,1 \text{ mol} = m/Mr$$

$$\text{➤ } m = 0,1 \text{ mol} \times 60,06 \text{ g/mol}$$

$$\begin{aligned} \rightarrow m &= 6,006 \text{ g} \\ \rightarrow m &= 6.006 \text{ mg} \\ 0,1 \text{ M} &= 6.006 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

Pengenceran dari 6.006 mg/L menjadi 100 mg/L :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$6.006 \text{ mg/L} \times V_1 = 100 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (100 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}) / 6.006 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,166 \text{ mL}$$

$$V_1 = 166 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan urea 0,1 M yang digunakan untuk membuat larutan stok urea 100 mg/L sebesar 166 μL .

D.16 Perhitungan pembuatan larutan stok urea 50 mg/L

Larutan stok urea 50 mg/L dibuat dari larutan urea 0,1 M yang diencerkan dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL:

Konversi dari M ke mg/L :

$$0,1 \text{ M} = 0,1 \text{ mol/L}$$

$$\rightarrow 0,1 \text{ mol} = m/Mr$$

$$\rightarrow m = 0,1 \text{ mol} \times 60,06 \text{ g/mol}$$

$$\rightarrow m = 6,006 \text{ g}$$

$$\rightarrow m = 6.006 \text{ mg}$$

$$0,1 \text{ M} = 6.006 \text{ mg/L}$$

Pengenceran dari 6.006 mg/L menjadi 50 mg/L :

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$6.006 \text{ mg/L} \times V_1 = 50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = (50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}) / 6.006 \text{ mg/L}$$

$$V_1 = 0,083 \text{ mL}$$

$$V_1 = 83 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan urea 0,1 M yang digunakan untuk membuat larutan stok urea 50 mg/L sebesar 83 μL .

D.17 Perhitungan pembuatan larutan stok amonia 100 mg/L

Larutan stok amonia 100 mg/L dibuat dengan mengencerkan amonia 25% menggunakan akuades hingga volume 100 mL:

$$\begin{aligned}[\text{Amonia } 25\%] &= \frac{\rho \times 10 \times \% \text{ kadar}}{Mr} \\ &= \frac{0,91 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 10 \times 25}{17 \text{ g/mol}} \\ &= 13,4 \text{ M}\end{aligned}$$

Konversi dari M ke mg/L :

$$\begin{aligned}13,4 \text{ M} &= 13,4 \text{ mol/L} \\ \text{➤ } 13,4 \text{ mol} &= m/Mr \\ \text{➤ } m &= 13,4 \text{ mol} \times 17 \text{ g/mol} \\ \text{➤ } m &= 227,8 \text{ g} \\ \text{➤ } m &= 227.800 \text{ mg} \\ 13,4 \text{ M} &= 227.800 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

Pengenceran dari 2,278 mg/L menjadi 100 mg/L :

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 227.800 \text{ mg/L} \times V_1 &= 100 \text{ mg/L} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= (100 \text{ mg/L} \times 100 \text{ mL}) / 227.800 \text{ mg/L} \\ V_1 &= 0,043 \text{ mL} \\ V_1 &= 43 \text{ }\mu\text{L}\end{aligned}$$

Jadi, larutan amonia 25% yang digunakan untuk membuat larutan stok amonia 100 mg/L sebesar 43 μ L.

D.18 Perhitungan pembuatan larutan amonia 50 mg/L

Larutan amonia 50 mg/L dibuat dengan mengencerkan amonia 100 mg/L menggunakan akuades hingga volume 100 mL:

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 100 \text{ mg/L} \times V_1 &= 50 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 5 \text{ mL}\end{aligned}$$

Jadi, larutan amonia 100 mg/L yang digunakan untuk membuat larutan amonia 50 mg/L sebesar 5 mL.

D.19 Perhitungan pembuatan larutan standar 0-11 mg/L

Variasi konsentrasi amonia 1 mg/L- 11 mg/L dibuat dengan mengencerkan amonia 50 mg/L dengan menggunakan akuades hingga volume 10 mL :

Pembuatan amonia 0 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 0 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0 \text{ mL}$$

Pembuatan amonia 1 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 1 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL}$$

Pembuatan amonia 3 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 3 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,6 \text{ mL}$$

Pembuatan amonia 5 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 5 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,0 \text{ mL}$$

Pembuatan amonia 7 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 7 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,4 \text{ mL}$$

Pembuatan amonia 9 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 9 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,8 \text{ mL}$$

Pembuatan amonia 11 mg/L

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ mg/L} \times V_1 = 11 \text{ mg/L} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2,2 \text{ mL}$$

Jadi, volume amonia 50 mg/L yang digunakan untuk membuat variasi konsentrasi amonia adalah sebagai berikut :

Tabel L.D.2 Pembuatan variasi konsentrasi amonia

[Amonia]	Volume Amonia 50 mg/L
(mg/L)	(mL)
0	0
1	0,2
3	0,6
5	1
7	1,4
9	1,8
11	2,2

Lampiran E. Data Hasil Penelitian

E.1 Optimasi konsentrasi formaldehid

Tabel L.E.1 Absorbansi Produk reaksi Hantzsch pada optimasi konsentrasi formaldehid

Konsentrasi Formadehid (%)	Absorbansi			Absorbansi Rata-rata
	1	2	3	
5	0,7769	0,7349	0,8058	0,7769
10	0,8173	0,8218	0,8256	0,8173
15	0,8802	0,8773	0,8836	0,8802
20	0,8651	0,8601	0,8653	0,8651
25	0,8519	0,8643	0,8544	0,8519

E.2 Perbandingan volume reagen dan sampel

Tabel L.E.2 Absorbansi Produk reaksi Hantzsch pada optimasi perbandingan volume segmentasi reagen dan sampel

Tipe	Absorbansi			Absorbansi Rata-rata
	1	2	3	
1	0,5016	0,4899	0,4891	0,4935
2	0,5303	0,5393	0,5234	0,5310
3	0,6754	0,6969	0,6758	0,6827
4	0,7659	0,7802	0,7863	0,7774
5	0,9269	0,9108	0,9277	0,9218
6	0,9961	0,9690	0,9695	0,9782

E.3 Optimasi waktu reaksi

Tabel L.E.3 Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada optimasi waktu reaksi

Waktu Reaksi	Absorbansi			Absorbansi Rata-rata
	1	2	3	
10	0,6132	0,6253	0,6147	0,6177
20	0,7518	0,7453	0,7542	0,7504
30	0,8153	0,8141	0,8364	0,8219
40	0,8729	0,8522	0,8582	0,8611
50	0,7949	0,8026	0,7756	0,7910
60	0,7896	0,7581	0,7728	0,7735

E.4 Kurva baku produk reaksi Hantzsch

Tabel L.E.4 Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada berbagai konsentrasi (0-11 mg/L)

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi
0	0,0522
1	0,1453
3	0,3063
5	0,4923
7	0,6412
9	0,7798
11	0,9323

E.5 Uji Pengaruh matriks pengganggu pada pengukuran amonia

Tabel L.E.5 Absorbansi produk reaksi Hantzsch pada penambahan variasi konsentrasi matriks pengganggu

Komponen	Konsentrasi Amonia Standar (mg/L)	Konsentrasi Matriks Pengganggu (mg/L)	Volume Total (µL)	Absorbansi
Histidin	5	0	50	0,4872
		5		0,4708
		25		0,4723
		50		0,4756
		0		0,4872
Kreatin	5	0	50	0,4680
		5		0,4770
		25		0,4869
		50		0,4872
		0		0,4707
Urea	5	0	50	0,4823
		5		0,4942
		25		
		50		
		0		

E.6 Pengukuran sampel 1 (aliran limbah cair laboratorium lapang Fakultas Peternakan UB)

Tabel L.E.6 Data pengukuran amonia pada sampel 1

Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	Rata-rata (mg/L)	RSD (%)
1	0,7145	8,09		
2	0,7471	8,50	8,39 ± 0,25	3,07
3	0,7527	8,57		

E.7 Pengukuran sampel 2 (aliran limbah cair peternakan di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang)

Tabel L.E.7 Data pengukuran amonia pada sampel 2

Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	Rata-rata (mg/L)	RSD (%)
1	0,6855	7,73		
2	0,7198	8,16	8,04 ± 0,27	3,36
3	0,7255	8,23		

E.8 Pengukuran sampel 3 (aliran limbah cair kawasan peternakan di Kecamatan Pujon Kabupaten Malang)

Tabel L.E.8 Data pengukuran amonia pada sampel 3

Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	Rata-rata (mg/L)	RSD (%)
1	0,7450	8,48		
2	0,7583	8,64	8,43 ± 0,23	2,78
3	0,7213	8,18		

KETERANGAN kondisi optimum pengukuran sampel pada konsentrasi formaldehid 15%, perbandingan volume reagen dan sampel dengan urutan segmen asetat formaldehid-sampel-*acetoacetanilide* (75 μ L:50 μ L:100 μ L), dan waktu reaksi 40 detik.

Lampiran F. Uji Statistik Optimasi Parameter

F.1 Uji statistik optimasi konsentrasi formaldehid

Untuk melihat kondisi optimum konsentrasi formaldehid yang digunakan sebagai reagen dalam penentuan amonia dengan metode SIA menggunakan reaksi Hantzsch, maka dilakukan uji statistik menggunakan uji F dengan langkah-langkah berikut :

Tabel L.F.1 Uji statistik absorbansi optimasi konsentrasi formaldehid

Konsentrasi Formaldehid (%)	Absorbansi			Absorbansi Rata-rata
	1	2	3	
5	0,7769	0,7349	0,8058	0,7725
10	0,8173	0,8218	0,8256	0,8216
15	0,8802	0,8773	0,8836	0,8804
20	0,8651	0,8601	0,8653	0,8635
25	0,8519	0,8643	0,8544	0,8569

- Menghitung faktor koreksi (FK)

$$FK = \frac{(\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij})^2}{p \times n} = \frac{(12,5845)^2}{15} = 10,5579$$

- Menghitung jumlah kuadrat (JK)

- JK total (JKt)

$$JK \text{ total} = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK$$

$$= (0,7769^2 + 0,7349^2 + \dots + 0,8544^2) - 10,5579$$

$$= 0,0247$$

- JK perlakuan (JKp)

$$JK \text{ perlakuan} = \frac{\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2}{n} - FK$$

$$= \frac{2,3176^2 + 2,4647^2 + 2,6411^2 + 2,5905^2 + 2,5706^2}{3} - 10,5579$$

$$= 0,0220$$

- JK galat (JKg)

$$JK_g = JK_t - JK_p = 0,0247 - 0,0220$$

$$= 0,0027$$

- Menghitung kuadrat tengah (KT) pada setiap sumber keragaman

- KT perlakuan (KTp)

$$KT_p = \frac{JK_p}{p-1} = \frac{0,0020}{5-1} = 0,0055$$

- KT galat (KTg)

$$KT_g = \frac{JK_g}{p(n-1)} = \frac{0,000}{5(3-1)} = 0,0002$$

- Menghitung nilai F

$$F_{hitung} = \frac{KT_p}{KT_g} = \frac{0,0055}{0,0002} = 20,4249$$

Tabel L.F.2 Tabel analisis sidik ragam satu arah

Sumber Keragaman	Df	JK	KT	F Hitung	F Tabel 0,05
Perlakuan	4	0,0220	0,0055	20,4249	3,48
Galat	10	0,0026	0,0002		
Total	14	0,0247	0,0057		

$$H_0 = P_1 = P_2 = P_3$$

$$H_1 = P_1 \neq P_2 \neq P_3$$

$F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 tidak diterima, maka terdapat perbedaan nyata pada setiap perlakuan sehingga selanjutnya dilakukan pengujian lebih lanjut dengan uji BNT.

- **Menentukan BNT**

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{(0,05)} &= t_{\text{tabel}}(\alpha, \text{df galat}) \times \sqrt{\frac{2KTg}{n}} \\ &= t_{\text{tabel}}(0,05, 10) \times \sqrt{\frac{2(0,0002)}{3}} = 0,0293 \end{aligned}$$

F.2 Uji statistik optimasi waktu reaksi

Untuk melihat kondisi optimum waktu reaksi yang digunakan dalam penentuan amonia dengan metode SIA menggunakan reaksi Hantzsch, maka dilakukan uji statistik menggunakan uji F dengan langkah-langkah berikut :

Tabel L.F.3 Uji statistik absorbansi optimasi waktu reaksi

Waktu Reaksi (detik)	Absorbansi			Absorbansi Rata-rata
	1	2	3	
10	0,6132	0,6253	0,6147	0,6177
20	0,7518	0,7453	0,7542	0,7504
30	0,8153	0,8141	0,8364	0,8219
40	0,8729	0,8522	0,8582	0,8611
50	0,7949	0,8026	0,7756	0,7910
60	0,7896	0,7581	0,7728	0,7735

- **Menghitung faktor koreksi (FK)**

$$\text{FK} = \frac{(\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij})^2}{p \times n} = \frac{(13,8472)^2}{18} = 10,6525$$

- **Menghitung jumlah kuadrat (JK)**

$$\begin{aligned} \text{JK total} &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - \text{FK} \\ &= (0,6132^2 + 0,6253^2 + \dots + 0,7728^2) - 10,6525 \\ &= 0,1066 \end{aligned}$$

- JK perlakuan (JKp)

$$\text{JK perlakuan} = \frac{\sum_{i=1}^p (\sum_{j=1}^n Y_{ij})^2}{n} - \text{FK}$$

$$= \frac{1,8532^2 + 2,2513^2 + 2,4658^2 + 2,5833^2 + 2,3731^2 + 2,3205^2}{3} - 10,6525$$

$$= 0,1050$$

- JK galat (JKg)

$$\text{JKg} = \text{JKt} - \text{JKp} = 0,1066 - 0,1050$$

$$= 0,0016$$

- **Menghitung kuadrat tengah (KT) pada setiap sumber keragaman**

- KT perlakuan (KTp)

$$\text{KTp} = \frac{\text{JKp}}{p-1}$$

$$= \frac{0,1050}{6-1} = 0,021$$

- KT galat (KTg)

$$\text{KTg} = \frac{\text{JKg}}{p(n-1)}$$

$$= \frac{0,0016}{6(3-1)} = 0,0001$$

- **Menghitung nilai F**

$$\text{F hitung} = \frac{\text{KTp}}{\text{KTg}}$$

$$= \frac{0,021}{0,0001} = 210$$

Tabel L.F.4 Tabel analisis sidik ragam satu arah

Sumber Keragaman	Df	JK	KT	F Hitung	F Tabel
Perlakuan	5	0,1050	0,021	210	0,05 3,11
Galat	12	0,0016	0,0001		
Total	17	0,1066	0,0211		

$$H_0 = P1 = P2 = P3$$

$$H1 = P1 \neq P2 \neq P3$$

$F_{hitung} > F_{tabel}$ maka H_0 tidak diterima, maka terdapat perbedaan nyata pada setiap perlakuan sehingga selanjutnya dilakukan pengujian lebih lanjut dengan uji BNT.

- **Menentukan BNT**

$$\begin{aligned} \text{BNT}_{(0,05)} &= t_{\text{tabel}}(\alpha, \text{df galat}) \times \sqrt{\frac{2KTg}{n}} \\ &= t_{\text{tabel}}(0,05, 12) \times \sqrt{\frac{2(0,0001)}{3}} = 0,0202 \end{aligned}$$

Lampiran G. Perhitungan Limit Deteksi dan % Recovery

G.1 Limit deteksi (LOD)

Tabel L.G.1 Absorbansi blanko pada pengukuran amonia

Blanko	Absorbansi	$(xi-\bar{x})^2$
1	0,0646	$5,74 \times 10^{-5}$
2	0,0589	$3,55 \times 10^{-6}$
3	0,0515	$3,04 \times 10^{-5}$
4	0,0522	$2,32 \times 10^{-5}$
5	0,0590	$3,92 \times 10^{-6}$
6	0,0504	$4,38 \times 10^{-5}$
7	0,0580	$9,60 \times 10^{-7}$
8	0,0554	$2,62 \times 10^{-6}$
9	0,0623	$2,78 \times 10^{-5}$
10	0,0579	$7,74 \times 10^{-7}$
Jumlah	0,5702	$1,94 \times 10^{-4}$

Absorbansi rata-rata dari blanko yaitu :

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_{10}}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{0,5702}{10} = 0,0570$$

Standar Deviasi blanko (n=10) adalah :

$$SD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (xi - \bar{x})^2}$$

$$= \sqrt{\frac{1,94 \times 10^{-4}}{9}}$$

$$= 0,0046$$

LOD (S/N=3)

$$A - A_B = 3 \cdot S_B$$

$$A = 3 \cdot S_B + A_B$$

$$= 3(0,0046) + 0,05702$$

$$= 0,070$$

Persamaan kurva baku:

$$Y = 0,0799 x + 0,0674$$

$$0,0709 = 0,0799 x + 0,0674$$

$$x = \frac{0,0709 - 0,0674}{0,0799}$$

$$x = 0,044 \text{ mg/L}$$

G.2 Perhitungan % recovery

Volume total sampel = 50 μL

10 % dari volume total sampel = 10% \times 50 μL

= 5 μL larutan standar

Konsentrasi larutan standar yang ditambah

$$= \frac{5 \mu\text{L}}{50 \mu\text{L}} \times 20 \text{ mg/L}$$

$$= 2 \text{ mg/L}$$

Tabel L.G.2 Absorbansi dan konsentrasi sampel setelah penambahan larutan standar

Sampel	Absorbansi		Absorbansi rata-rata	Konsentrasi (mg/L)
	1	2		
1	0,8053	0,8454	0,8480	9,58
2	0,8066	0,8371	0,8042	9,49
3	0,8821	0,8812	0,8448	10,03

Sampel 1 :

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C \text{ total} - C \text{ ditambah}}{C \text{ sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Recovery} = \frac{9,58 \text{ ppm} - 2 \text{ ppm}}{8,39 \text{ ppm}} \times 100\%$$

$$= 90,30 \%$$

Sampel 2 :

$$\% Recovery = \frac{C_{total} - C_{ditambah}}{C_{sampel}} \times 100\%$$

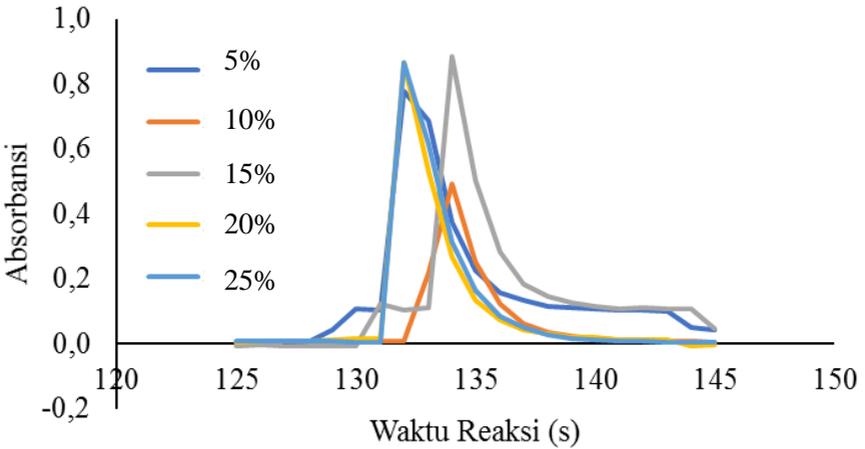
$$\% Recovery = \frac{9,36 \text{ ppm} - 2 \text{ ppm}}{8,04 \text{ ppm}} \times 100\%$$
$$= 91,58 \%$$

Sampel 3 :

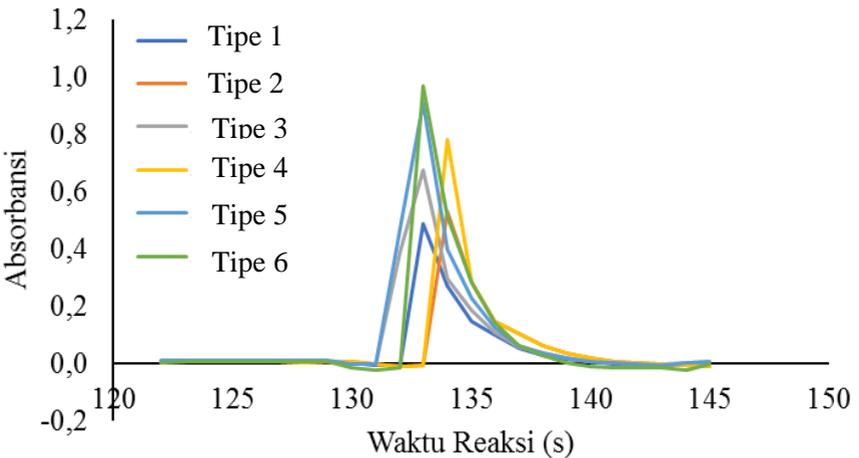
$$\% Recovery = \frac{C_{total} - C_{ditambah}}{C_{sampel}} \times 100\%$$

$$\% Recovery = \frac{10,03 \text{ ppm} - 2 \text{ ppm}}{8,43 \text{ ppm}} \times 100\%$$
$$= 95,25 \%$$

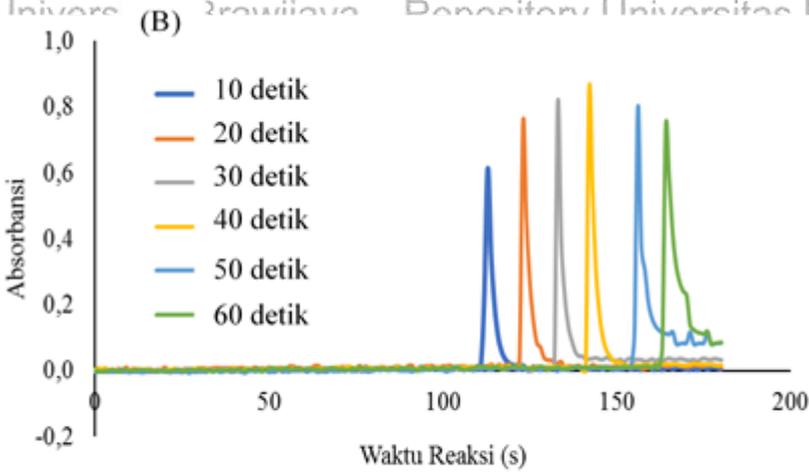
Lampiran H. SIA-gram Pengukuran



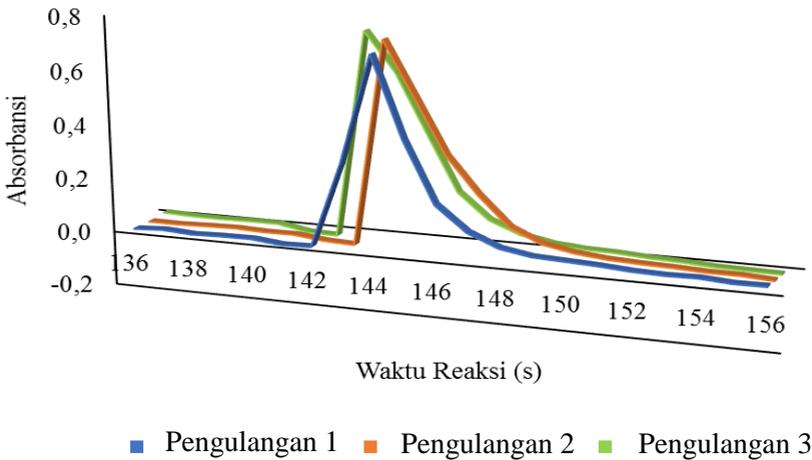
Gambar L.H.1 SIA-gram optimasi konsentrasi formaldehid



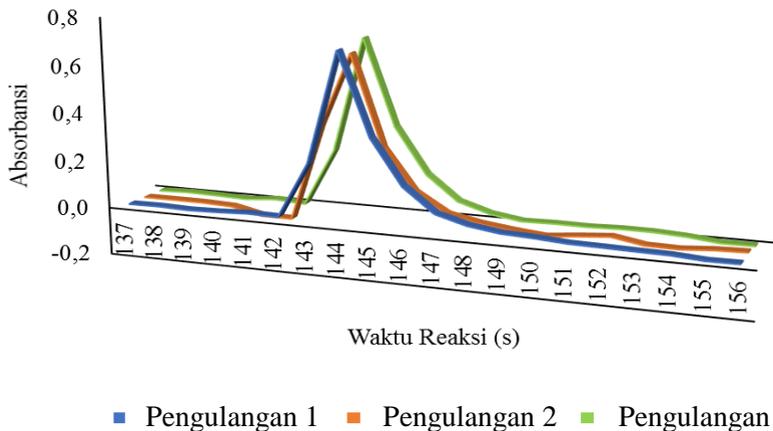
Gambar L.H.2 SIA - gram optimasi perbandingan volume reagen dan sampel



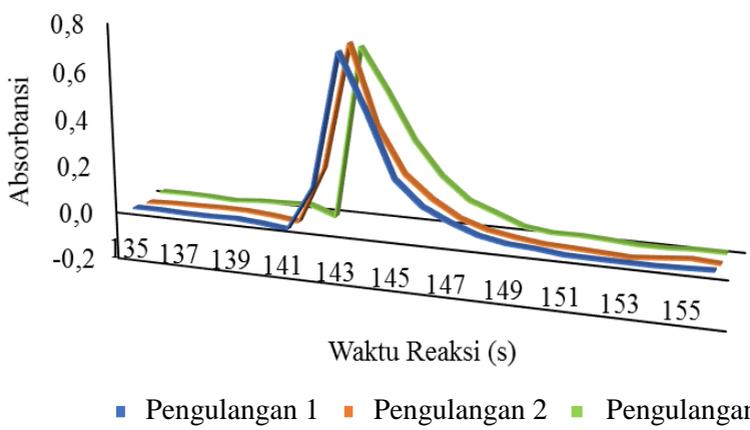
Gambar L.H.3 SIA-gram optimasi waktu reaksi



Gambar L.H.4 SIA-gram pengukuran sampel 1



Gambar L.H.5 SIA-gram pengukuran sampel 2



Gambar L.H.6 SIA-gram pengukuran sampel 3



Lampiran I. Kondisi Operasional SIA

Tabel L.I.1 Kondisi operasional SIA

No.	Prosedur	SP <i>Valve</i>	SP Position	SL Position	Laju Alir ($\mu\text{L}/\text{detik}$)	Volume (μL)
1.	Pencucian line					
	a. Pengambilan akuades	<i>In</i>	<i>Aspirate</i>	-	200	2500
	b. Pencucian <i>mixing tips</i>	<i>Out</i>	<i>Dispense</i>	1	100	500
	c. Pencucian line	<i>Out</i>	<i>Dispense</i>	3,4,5,6	100	500
	d. Pengambilan akuades	<i>In</i>	<i>Aspirate</i>	-	200	1000
	e. Pencucian line	<i>Out</i>	<i>Dispense</i>	7,8	100	500
2.	Pencucian detektor					
	a. Pengambilan akuades	<i>In</i>	<i>Aspirate</i>	-	50	2500
	b. Pencucian detektor	<i>In</i>	<i>Aspirate</i>	2	200	2500
		<i>Out</i>	<i>Dispense</i>	-	50	2500



3.	Pengisian line dengan larutan						
	a. Pengambilan larutan reagen asetat-formaldehid	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	6	10	75	
	b. Pengambilan larutan amonia	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	7	10	50	
	c. Pengambilan larutan reagen <i>acetoacetanillid</i>	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	8	10	100	
4.	Pendeteksian Amonia						
	a. Pengambilan larutan reagen asetat-formaldehid	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	6	10	75	
	b. Pengambilan larutan amonia	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	7	10	50	
	c. Pengambilan larutan reagen <i>acetoacetanillide</i>	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	8	10	100	
	d. Pengambilan produk menuju <i>mixing tip</i>	<i>Out</i>	<i>Dispense</i>	1	10	10	
	e. Penarikan produk menuju holding coil	<i>Out</i>	<i>Aspirate</i>	1	50	225	
	f. Pengambilan akuades						
	g. Pengaliran produk menuju detektor	<i>In</i> <i>Out</i>	<i>Aspirate</i> <i>Dispense</i>	- 2	200 175	2500 2500	



5.	Uji Matriks Pengganggu					
	a. Pengambilan larutan reagen asetat-formaldehid	Out	Aspirate	6	10	75
	b. Pengambilan larutan amonia	Out	Aspirate	7	10	5
	c. Pengambilan larutan matriks pengganggu	Out	Aspirate	4	10	0,5,20,25
	d. Pengambilan akuades	Out	Aspirate	5	10	
	e. Pengambilan larutan reagen acetoacetanillide	Out	Aspirate	8	10	45,40,25
	f. Pengambilan produk menuju mixing tip	Out	Dispense	1	10	100
	g. Penarikan produk menuju holding coil	Out	Aspirate	1	50	10
	h. Pengambilan akuades					225
	i. Pengaliran produk menuju detektor	In	Aspirate	-	200	
		Out	Dispense	2	175	2500
						2500

Lampiran J. Dokumentasi Alat dan Bahan



Gambar L.J.1 Rangkaian alat SIA



Gambar L.J.2 *Syringe pump SIA*



Gambar L.J.3 *Syringe Valve SIA*



Gambar L.J.4 *Mixing tip*



Gambar L.J.5 Detektor spektrofotometer UV-Vis



Gambar L.J.6 Acetoacetanilide.

Lampiran K. Dokumentasi Sampling dan Preparasi Sampel

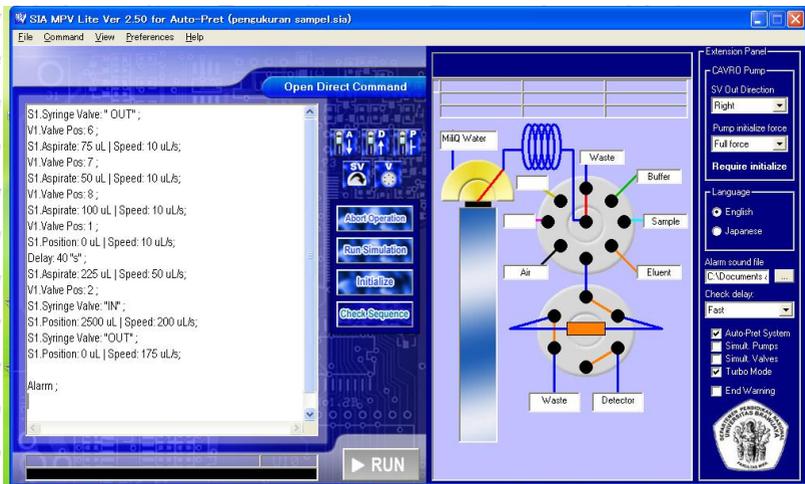


Gambar L.K.1 Sampling



Gambar L.K.2 Preparasi larutan sampel

Lampiran L. Contoh Tampilan Perintah



Gambar L.L.1 Perintah pendeteksian amonia menggunakan aplikasi pada metode SIA

Pendeteksian amonia pada sampel limbah cair peternakan sapi dilakukan dengan menggunakan perintah yang diawali dengan pengambilan reagen asetat-formaldehid pada pos 6 sebanyak 75 μL , pengambilan larutan sampel pada pos 7 sebanyak 50 μL , dan pengambilan reagen *acetoacetanillide* pada pos 8 sebanyak 100 μL . Pengambilan larutan tersebut masing-masing dilakukan dengan kecepatan sebesar 10 $\mu\text{L}/\text{detik}$. Selanjutnya, semua larutan yang telah diambil dialirkan menuju *mixing tip* pada pos 1, selanjutnya direaksikan selama waktu optimum yaitu 40 detik. Kemudian, semua larutan yang telah bereaksi membentuk produk reaksi Hantzsch dialirkan menuju pos 2 yang dihubungkan dengan detektor dan dideteksi absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kecepatan yang digunakan untuk mengalirkan produk menuju detektor dengan laju alir sebesar 175 $\mu\text{L}/\text{detik}$.

Lampiran M. Peraturan Menteri Lingkungan Hidup Nomor 5 Tahun 2014

LAMPIRAN XX
PERATURAN MENTERI LINGKUNGAN HIDUP
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 5 TAHUN 2014
TENTANG
BAKU MUTU AIR LIMBAH

**BAKU MUTU AIR LIMBAH BAGI USAHA DAN/ATAU KEGIATAN
PETERNAKAN SAPI DAN BABI**

Parameter	Kadar Paling Tinggi (mg/L)	Beban Pencemaran Paling Tinggi (gram/ekor/hari)	
		Sapi	Babi
BOD	100	20	4
COD	200	40	8
TSS	100	20	4
NH3-N	25	5	1
pH		6 - 9	
Kuantitas air limbah paling tinggi		Sapi : 200 ltr/ekor/hari Babi : 40 ltr/ekor/hari	

MENTERI LINGKUNGAN HIDUP
REPUBLIK INDONESIA,

BALTHASAR KAMBUAYA