

METODE ALTERNATIF ANALISIS INSEKTISIDA PERTANIAN DELTAMETHRIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI Penggunaan Kolom C-18, Fase Gerak Asetonitril 80% dalam Akuabides, Laju Alir Fase Gerak 1,6 ml/menit, dan Panjang Gelombang Detektor UV-Vis 190 nm

Alternative Method of Farming Insecticide - Deltamethrin Analyzes Using High Performance Liquid Chromatography

Use of Column C-18, Mobile Phase Acetonitrile 80% in Aquabides, Flow Rate of Mobile Phase 1.6 ml/minute, and Wavelength of UV-Vis Detector 190 nm

R. Gagak Donny Satria, Bambang Sumiarto, Andi Trisyono, Agustina Dwi Wijayanti

ABSTRACT

Deltamethrin is a common pesticide used in plants and animals. Research about this pesticide has been done with various methods. The purpose of this research was to validate the alternative test method of deltamethrin using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). This research used pure deltamethrin. The tool in this research was HPLC Shimadzu 6.1 with 80% acetonitrile in aquabides for mobile phase, flow rate 1.6 ml/min and uv-vis detector wavelength 190 nm. The data were analyzed by calculated the average, standard deviation, and relative standard deviation. The results showed the average area for each concentration of 0.1 ug/ml, 0.25 ug/ml, 0.3 ug/ml, 0.5 ug/ml, 0.75 ug/ml, 1 ug/ml, 2 ug/ml, and 5 ug/ml, were 52806.33, 119070.3, 137758.3, 220292, 339677.3, 449448.7, 856049.3, and 2,177,558, with a linear equation $y = 43283x + 8455$, $R = 0,999$. It could be concluded that the method is valid based on precision, acuration, specificity, limit of detection, limit of quantification, and linearity.

Keyword: deltamethrin, HPLC, validation

PENDAHULUAN

Deltamethrin merupakan insektisida sintesis golongan piretroid yang digunakan secara luas, baik pada bidang pertanian maupun peternakan (National Pesticide Information Center, 2012). Tidak hanya berefek pada insekta, pestisida ini juga dapat memberi dampak buruk pada manusia maupun hewan, jika terpapar dalam jumlah tertentu melebihi ambang batas (Gilbert, 2012).

Penggunaan KCKT dalam teknologi analisis memiliki beberapa keunggulan apabila dibandingkan dengan metode kromatografi yang lain, yaitu waktu analisis yang cepat dan mempunyai daya pisah yang baik (Johnson dan Stevenson, 1991). Keadaan ini menstimulasi peneliti untuk terus mengembangkan metode dan prosedur analisis sehingga didapatkan hasil yang terbaik. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Satria dkk. (2011) dan Kim dkk. (2006),

menunjukkan bahwa penggunaan alat KCKT dengan penetapan standar operasional tertentu menunjukkan hasil yang baik dari segi linearitas, presisi maupun akurasi. Variabel operasional yang terus mengalami perkembangan dalam analisis menggunakan KCKT adalah jenis kolom, jenis fase gerak, laju alir fase gerak, jenis detektor, panjang gelombang detektor, dan sebagainya.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis deltamethrin menggunakan alat KCKT, dengan kolom C-18, fase gerak asetonitril 80% dalam akuabides, laju alir fase gerak 1,6 ml/menit, dan panjang gelombang detektor UV-Vis 190 nm, serta didasarkan pada spesifisitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, akurasi, presisi, dan linearitas.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pemahaman kepada peneliti lain atau pihak-pihak yang

membutuhkan, tentang validitas analisis deltamethrin dengan menggunakan alat KCKT. Diharapkan pula hasil penelitian ini dapat menjadi salah satu referensi untuk pengembangan penelitian selanjutnya.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Daerah Istimewa Yogyakarta. Menggunakan seperangkat alat KCKT Shimadzu 6.1. Kolom yang digunakan adalah ODS C-18, fase gerak asetonitril (Baker Analyzed ®HPLC Reagent) 80% dalam akuabides, laju alir fase gerak 1,6 ml/menit, dan panjang gelombang detektor UV-Vis 190 nm. Metode penelitian yang digunakan merupakan modifikasi dari metode yang telah dikembangkan oleh Kim dkk (2006).

Persediaan/stok pengenceran dibuat dengan konsentrasi 0,5 µg/ml; 1,25 µg/ml; 1,5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 3,75 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; dan 25 µg/ml dari 100 µg/ml. Tiap stok pengenceran yang ada diambil 30 µl, dimasukkan dalam tabung yang telah berisi 120 µl asetonitril 100%, kemudian dilabelisasi sehingga menjadi sediaan berturut-turut 0,1 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,75 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, dan 5 µg/ml. Langkah selanjutnya adalah injeksi ke sistem kolom KCKT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa area puncak kromatografi untuk Deltamethrin akan muncul pada waktu retensi 6 sampai 8 menit. Hasil analisis sampel deltamethrin secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil keluaran analisis deltamethrin menggunakan alat kromatografi cair kinerja tinggi

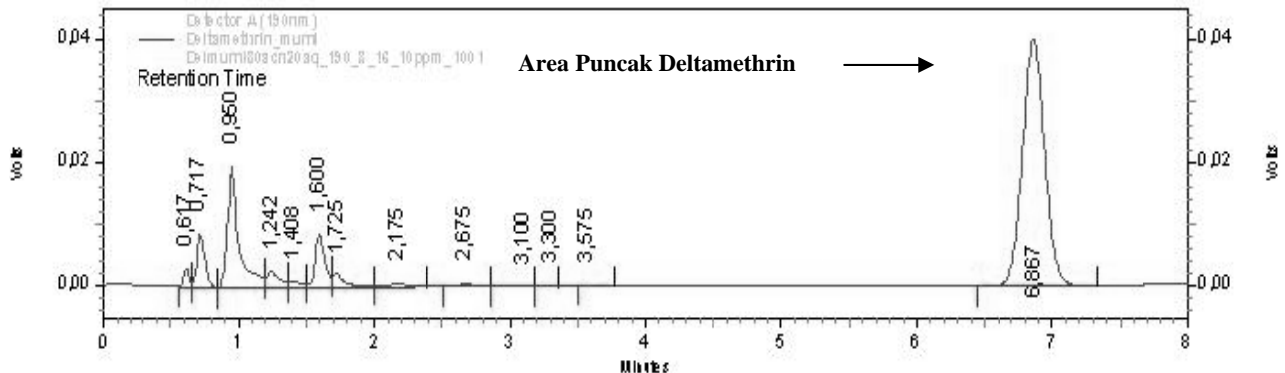
Konsentrasi	Pengulangan	Luas area	Rata-rata luas area	Standar deviasi	RSD
0,1 ug/ml	1	53.063	52.806,33	1.183,069	0,0224
	2	53.840			
	3	51.516			
0,25 ug/ml	1	108.965	119.070,3	12.934,99	0,1086
	2	133.648			
	3	114.598			
0,3 ug/ml	1	136.148	13.7758,3	1.555,728	0,0112
	2	137.874			
	3	139.251			
0,5 ug/ml	1	216.026	220.292	6.605,728	0,0299
	2	216.949			
	3	227.901			
0,75 ug/ml	1	325.471	339.677,3	21.398,89	0,0629
	2	364.289			
	3	329.272			
1 ug/ml	1	450.936	449.448,7	11.856,18	0,0263
	2	436.919			
	3	460.491			
2 ug/ml	1	856.354	856.049,3	37.392,93	0,0436
	2	818.505			
	3	893.289			
5 ug/ml	1	2.196.617	2.177.558	16.609,66	0,0053
	2	2.169.885			
	3	2.166.172			

Penambahan deltamethrin dengan berbagai konsentrasi yang berbeda menunjukkan luas area yang bervariasi sesuai dengan konsentrasi deltamethrin yang ditambahkan. Semakin tinggi konsentrasi deltamethrin yang ditambahkan pada pelarut, maka luas area yang terbaca pada *output* akan semakin besar. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi deltamethrin, maka luas area yang

terbaca pada *output* juga akan menunjukkan nilai yang semakin kecil.

Spesifisitas

Penentuan spesifisitas hasil analisis suatu metode diperoleh dengan membandingkan hasil keluaran analisis deltamethrin, berupa area puncak pada kromatogram.



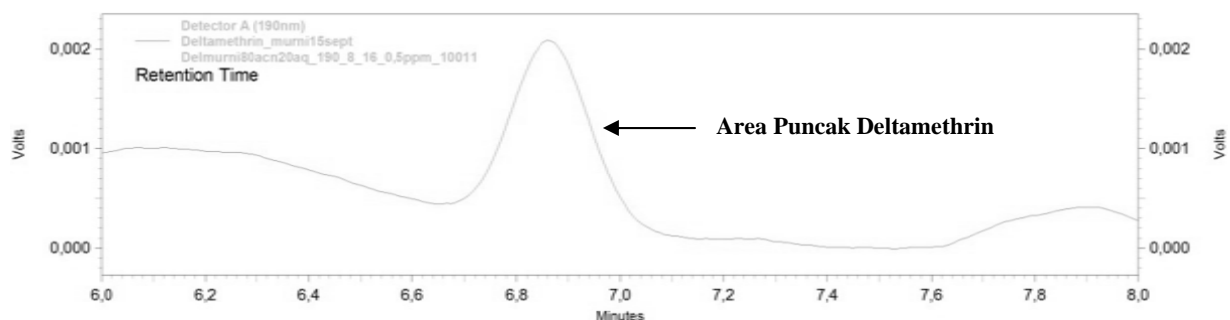
Gambar 1. Contoh kromatogram hasil analisis deltamethrin

Spesifitas suatu metode analisis adalah kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti adanya pengganggu.

Seperti yang terlihat dari hasil kromatogram pada Gambar 1 diatas, alat dengan metode yang digunakan dapat mendeteksi dengan cermat senyawa deltamethrin, dengan area puncak yang tidak terganggu zat-zat lain.

Batas deteksi / *Limit of Detection (LOD)*

Definisi LOD yaitu konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, namun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Ahuja dan Dong, 2005; Rohman, 2009; Snyder dkk., 1997). Dari hasil penelitian diketahui bahwa LOD pada metode pengujian ini adalah pada konsentrasi 0,05 $\mu\text{g/ml}$, seperti yang terlihat pada Gambar 2. Kromatogram yang dihasilkan (melalui proses delay) menunjukkan pada konsentrasi tersebut masih muncul bentukan puncak tetapi tidak terbaca luas area yang ada.

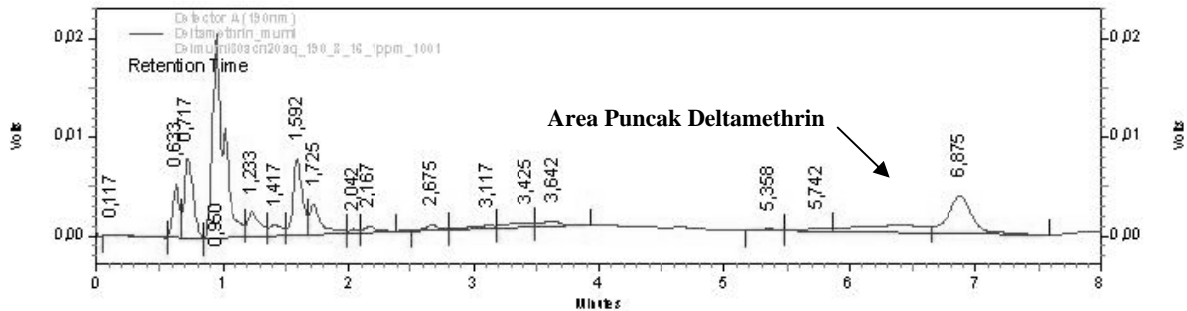


Gambar 2. Kromatogram batas deteksi yang tidak dapat dikuantifikasi 0,05 $\mu\text{g/ml}$

Batas kuantifikasi / *Limit of Quantification* (LOQ)

Penentuan LOQ dalam penelitian ini berdasarkan analisis dari kromatogram dari pengenceran yang ada. Definisi LOQ yaitu konsentrasi terendah suatu sampel yang dapat dianalisis secara kuantitatif (Ahuja dan Dong,

2005 ; Rohman, 2009; Snyder dkk., 1997). Berdasarkan definisi tersebut, maka LOQ dari metode penelitian ini adalah 0,1 µg/ml. Konsentrasi 0,1 µg/ml merupakan batas terkecil konsentrasi sampel yang dapat memunculkan area puncak serta terkuantifikasi luas areanya pada kromatogram.



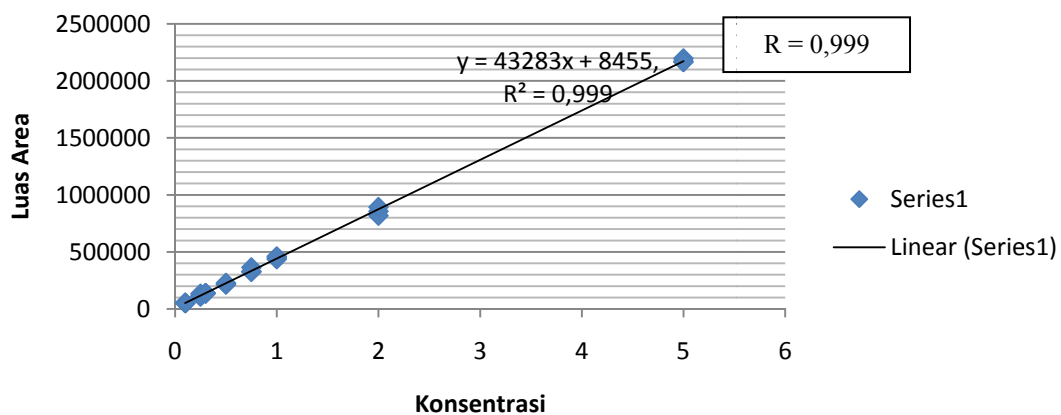
Gambar 3. Batas minimal konsentrasi yang bisa dikuantifikasi 0,1 µg/ml

Presisi

Presisi dilakukan untuk melihat kedekatan antar serangkaian hasil analisis. Penentuan presisi pada penelitian ini, dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali pada tiap sampel untuk mengetahui tingkat keterulangan, seperti yang terlihat pada Tabel 1. Setiap pengulangan dengan konsentrasi yang sama menunjukkan hasil yang konstan dari segi luas area puncak serta waktu retensi. Hasil penghitungan menunjukkan angka standar deviasi relatif untuk semua konsentrasi, adalah memenuhi syarat yaitu $\leq 2\%$.

Linearitas

Hasil rerata luas area puncak paling tinggi dicapai oleh deltamethrin dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 5 µg/ml, kemudian diikuti oleh konsentrasi 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,75 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,3 µg/ml, 0,25 µg/ml dan yang paling rendah adalah konsentrasi 0,1 µg/ml. Hasil tersebut kemudian diolah korelasinya sehingga diperoleh persamaan linear $y = 432830x + 8455$, dengan $R = 0,9994$, dimana x menunjukkan konsentrasi, dan y menunjukkan luas area. Seperti yang tersaji dalam Gambar 4 berikut.



Gambar 4. Grafik linearitas hasil analisis deltamethrin murni

Menurut Rohman (2009), minimal 5 kisaran konsentrasi harus diamati dan suatu plot antara respon detektor dengan konsentrasi sampel harus dihasilkan. Selain itu, saat menggunakan kalibrasi titik tunggal, data linearitas regresi seharusnya tidak dipaksa melalui titik nol. Pengujian ini dapat dikatakan memenuhi persyaratan karena menggunakan 8 konsentrasi berbeda, yang semuanya menimbulkan respon detektor berupa

munculnya puncak area pada waktu retensi tertentu.

Akurasi

Akurasi merupakan kedekatan antara nilai terukur (nilai rata-rata hasil analisis) dengan nilai yang diterima sebagai nilai sebenarnya, baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, ataupun nilai rujukan (Rohman, 2009).

Tabel 2. Hasil perhitungan akurasi hasil analisis pada berbagai konsentrasi

Konsentrasi	Rerata luas area	Perolehan kembali
0,1 ug/ml	52.806,33	100,8%
0,25 ug/ml	119.070,3	102,24%
0,3 ug/ml	13.7758,3	99,5%
0,5 ug/ml	220.292	97,88%
0,75 ug/ml	339.677,3	102,02%
1 ug/ml	449.448,7	101,89%
2 ug/ml	856.049,3	97,9%
5 ug/ml	2.177.558	100,22%

Akurasi dapat dilihat dari persen perolehan kembali. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan dalam sampel dapat ditemukan dalam pengujian (Harmita, 2004). Hasil perhitungan akurasi dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai perolehan kembali yang didapat 97,9% - 102,24%. Nilai akurasi yang mendekati 100% menunjukkan semakin dekatnya nilai hasil analisis dengan nilai yang ditambahkan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa metode analisis deltamethrin murni menggunakan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan kolom C-18, fase gerak asetonitril 80% dalam akuabides, laju alir fase gerak 1,6 ml/menit, dan panjang gelombang detektor UV-Vis 190 nm, memiliki validitas yang baik dari segi spesifisitas, batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, linearitas dan akurasi.

Dari hasil penelitian diharapkan dapat dikembangkan dengan penelitian pengembangan alternatif prosedur metode yang lain. Penelitian lanjutan dapat juga dilakukan berupa validasi pada pemeriksaan

residu deltamethrin pada bahan-bahan pertanian, jaringan atau organ biologis, dan sebagainya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahuja, S. dan Dong, M.W. 2005. *Handbook or Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier Inc, Amsterdam. Hal : 197-207.
- Gilbert, S. G. 2012. *A Small Dose of Toxicology The Health Effects of Common Chemicals 2nd Edition*. Healthy Word Press, United States. Hal : 80-85.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. I, No.3. Desember : 117-135.
- Johnson, E.L. dan Stevenson, R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Penerbit ITB, Bandung. Hal : 1 – 8.
- Kim K.B., Bartlett M.G., Anand S.S., Bruckner J.V., Kim H.J. 2006. *Rapid Determination of The Synthetic Pyrethroid Insecticide, Deltamethrin, in rat Plasma and Tissues by HPLC*. Journal of Chromatography B 834 : 141 – 148.
- National Pesticide Information Center. 2012. *Deltamethrin*. Diakses pada

<http://www.epa.gov/pesticides/deltamethrin>. [2 desember 2012].

Rohman, A. 2009. *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Graha Ilmu, Yogyakarta. Hal : 111-234.

Satria G.D., Wijayanti, A. D., Wikan, P., Nurul, A., Prana, D., Acintya, R. 2011. *Chromatogram Analysis to Detect The Deltamethrin Added in The Muscle of Chicken Using The High Performance*

Liquid Chromatography. Proceeding International Advance Technology on Veterinary and Life Scientist. Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta. Hal : 313 – 318.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L. 1997. *Practical HPLC Method Development, 2nd Ed*. John Wiley & Sons, Inc, New York. Hal : 691-693.