



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU PESTISIDA
METOMIL MENGGUNAKAN BUAH TIMUN ORGANIK
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI PASCA
KOLOM**

SKRIPSI

**MERIEN FRENTINIA
07061975540**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU PESTISIDA
METOMIL MENGGUNAKAN BUAH TIMUN ORGANIK
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI PASCA
KOLOM**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Farmasi**

**MERIEN FRENTINIA
07061975540**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

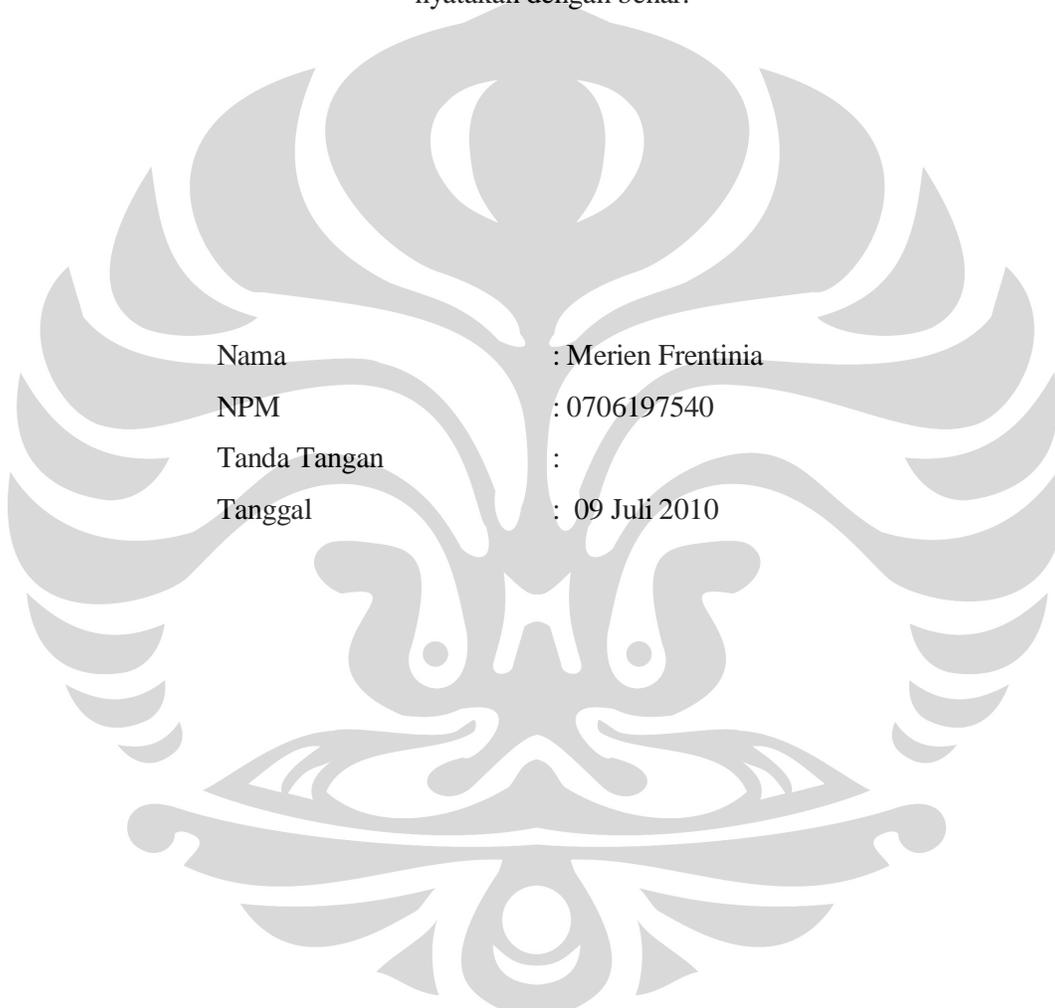
Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Merien Frentinia

NPM : 0706197540

Tanda Tangan :

Tanggal : 09 Juli 2010



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Merien Frentinia
NPM : 0706197540
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul Skripsi : Validasi Metode Analisis Residu Pestisida Metomil
Menggunakan Buah Timun Organik secara
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pasca Kolom

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Arry Yanuar, M.Si (.....)
Pembimbing II : Drs. Bambang Wispriyono, Apt., Ph.D (.....)
Penguji I : Dr. Harmita, Apt. (.....)
Penguji II : Dra. Juheini Amin, M.Si (.....)
Penguji III : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 9-7-2010

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala nikmat dan karunia-Nya, serta bantuan dan pertolongan yang telah diberikan sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada masa penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

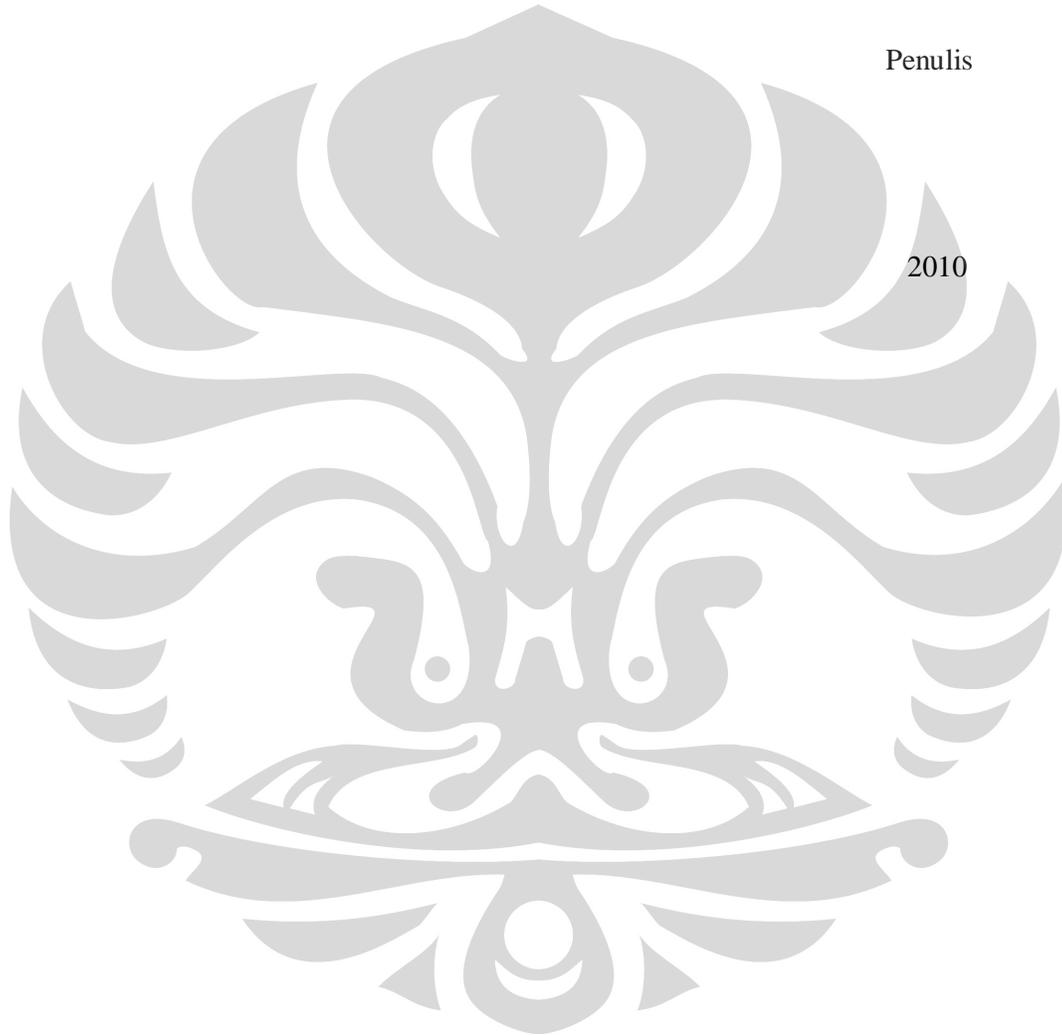
1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Bapak Dr. Arry Yanuar M.Si. selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran serta kesabaran dalam membimbing, memberikan dukungan, arahan, dan bantuan selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Dr. Bambang Wispriyono Apt., Ph.D selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis dan memberikan bantuan serta saran selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Ibu Santi Purna Sari S.Si., M.Si selaku pembimbing akademik atas dukungan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
5. Ibu Laila Fitria, S.KM M.KM, selaku penanggung jawab Laboratorium Kesehatan Lingkungan FKM serta bapak Haryo dan semua staf Laboratorium Kesehatan Lingkungan FKM yang senantiasa membantu penulis dalam penelitian.
6. Bapak Kusuma, bapak Iskandar, bapak Zaqy dari Waters atas ketersediaannya membantu memperbaiki alat KCKT selama penelitian berlangsung.
7. Seluruh staff pengajar dan karyawan Departemen Farmasi, terimakasih atas segala arahan dan bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung.
8. Keluargaku tercinta umi, papa, dan ayuk atas terimakasih cinta kasih, optimisme dan doa yang penulis terima.

9. Merrylin Saragih dan mbak HERNI ASIH SETYORINI, terima kasih atas waktu, kerjasama pemikiran, serta kenyamanan yang penulis terima selama penelitian ini berlangsung.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2010



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

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

Nama : Merien Frentinia
NPM : 0706197540
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

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

Validasi Metode Analisis Residu Pestisida Metomil Menggunakan Buah Timun Organik secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pasca Kolom beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 09 Juli 2010

Yang menyatakan

(Merien Frentinia)

ABSTRAK

Nama : Merien Frentinia
Study Program : Ekstensi Farmasi 2007
Title : Validasi Metode Analisis Residu Pestisida Metomil
Menggunakan Buah Timun Organik secara Kromatografi Cair
Kinerja Tinggi Pasca Kolom

Metomil merupakan salah satu senyawa pestisida N-metilkarbamat yang biasa digunakan sebagai pestisida. Metomil merupakan penghambat kerja asetilkolin yang dapat menyebabkan kerusakan pada sistem syaraf pusat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh metode ekstraksi dan metode analisis yang lebih baik untuk residu pestisida metomil di dalam sampel. Metomil dapat dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan detektor fluoresensi melalui proses hidrolisis dan derivatisasi. Proses derivatisasi metomil dilakukan pada reaktor pasca kolom menggunakan ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol yang sebelumnya telah dihidrolisis menggunakan natrium hidroksida. Kondisi analisis yang digunakan yaitu kolom fase terbalik dimetiloktadesilsilil (*Waters Carbamate Coloumn* 3,9 x 150 mm), suhu kolom 30⁰C, komposisi fase gerak air-metanol-asetonitril dielusi secara gradien dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit, suhu reaktor pasca kolom 80⁰C, kecepatan alir reagen pasca kolom masing-masing 0,5 mL/menit dan panjang gelombang eksitasi 339 nm serta panjang gelombang emisi 445 nm. Metode ini sesuai dengan persyaratan validasi yang diminta berdasarkan linearitas, akurasi dan presisi dengan koefisien korelasi 0,9997 serta batas deteksi dan batas kuantitasi metomil berturut-turut adalah 2,73 ng/mL dan 9,10 ng/mL. Untuk metode ekstraksi digunakan sampel buah timun organik yang dianalisis secara simulasi. Buah timun diekstraksi dengan asetonitril dan natrium klorida, kemudian ekstrak yang didapatkan dimurnikan dengan SPE Aminopropil melalui dua belas kali elusi menggunakan metanol-diklormetan=(1:99). Hasil pada analisis sampel menggunakan menunjukkan perolehan kembali yang sangat kecil yaitu 28,86%.

Kata kunci : derivatisasi, metomil, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, fluoresensi, pasca kolom.

xiv + 71 hlm; gbr; lamp; tab.

Bibliografi : 27 (1989-2009)

ABSTRACT

Name : Merien Frentinia
Study Program : Pharmacy Extension 2007
Title : Validation of Analytical Method of Pesticide Residue Methomyl
Using Organic Cucumber by Post Coloumn High Performance
Liquid Chromatography

Methomyl is one of the N-Methylcarbamate pesticide compound commonly used as pesticides. Methomyl is working inhibiting acetylcholine which can cause damage to the central nervous system. The purpose of this research is to obtain methods of extraction and analytical methods for better methomyl pesticide residues in samples. Methomyl can be analyzed using High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detector through a process of hydrolysis and derivatization. Methomyl derivatization process performed on post-column reactor using ortoftalaldehyd and 2-mercaptoetanol which had been hydrolysed previously using sodium hydroxide. Analytical conditions that were used are reversed phase column dimetiloktadesilsilil (Waters carbamate Coloumn 3.9 x 150 mm), 30⁰C coloumn temperature, mobile phase composition of water-methanol-acetonitrile in a gradient elution with flow rate 1.5 mL / min, post-column reactor temperature are 80⁰C , post-coloumn reagent flow rate of each 0.5 mL/min and 339 nm excitation wavelength and emission wavelength of 445 nm. This method in accordance with the requirements of the validation requested based on the linearity, accuracy and precision with a correlation coefficient of 0.9997 and detection limit and quantization limit of methomyl in a row is 2.73 ng/mL and 9.10 ng/mL. Organic cucumber samples were used for the extraction method analyzed by simulation. Cucumbers were extracted with acetonitrile and sodium chloride, then purified extracts obtained by SPE Aminopropil through twelve times elution using methanol-dichloromethane= (1:99). The result of this analysis produces a very small recovery that is 28.86%.

Keyword : derivatization, methomyl, High Performance Liquid Chomatography, fluorescence, post coloumn.

xiii + 71 pages ; appendix; figure; table.

Bibliography : 27 (1989-2009).

DAFTAR ISI

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	3

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pestisida Karbamat.....	4
2.2. Penyerapan Pestisida dalam Tanaman.....	7
2.3. Mekanisme Peracunan Pestisida Karbamat.....	7
2.4. Analisis Kuantitatif Residu Pestisida.....	8
2.5. Hidrolisis dan Derivatisasi.....	8
2.6. Reaktor Pasca Kolom.....	12
2.7. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	12
2.8. Analisis Kuantitatif dengan KCKT.....	15
2.9. Terori Kolom.....	16
2.10. Validasi Metode Analisis.....	17
2.11. Metode Analisis Residu Pestisida N-Metilkarbamat.....	20

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	23
3.2. Alat.....	23
3.3. Bahan.....	23
3.4. Cara Kerja.....	25

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Larutan Standar.....	30
4.2. Kondisi Analisis Optimum.....	31
4.3. Uji Kesesuaian Sistem.....	32
4.4. Uji Linearitas.....	34

4.5. Uji Ketepatan(Akurasi) dan Keseksamaan (presisi).....	37
4.6. Uji Stabilitas.....	40
4.7. Orientasi SPE.....	41
4.8. Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi) dari Sampel.	43
4.9. Uji Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi.....	46

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan	48
5.2. Saran.....	48

DAFTAR ACUAN	49
---------------------------	----



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia metomil.....	5
Gambar 2.2. Struktur kimia BDMC.....	6
Gambar 2.3. Reaksi hidrolisis serta derivatisasi golongan N-Metilkarbamat.....	11
Gambar 4.4. Kromatogram campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL.....	34
Gambar 4.5. Kurva kalibrasi standar metomil.....	36
Gambar 4.6 Kromatogram LOD standar metomil konsentrasi 2,012 ng/mL Dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL.....	36
Gambar 4.7. Kromatogram campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC 109,0 ng/mL hasil uji Aminopropil.....	42
Gambar 4.8 Kromatogram campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL hasil uji SPE C-18.....	43
Gambar 4.9 Kromatogram campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL yang diekstraksi dari sampel simulasi dan internal standar BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL yang ditambahkan pada rekonstitusi terakhir.....	47

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Komposisi fase gerak gradien aplikasi a.....	20
Tabel 2.2. Komposisi fase gerak gradien aplikasi b.....	20
Tabel 2.3. Komposisi fase gerak gradien aplikasi c.....	21
Tabel 4.4. Komposisi fase gerak gradien.....	31
Tabel 4.5 Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem metomil.....	33
Tabel 4.6 Hasil pengukuran kurva kalibrasi metomil.....	35
Tabel 4.7 Hasil pengukuran kecermatan (akurasi) metomil.....	38
Tabel 4.8 Hasil pengukuran keseksamaan (presisi) metomil.....	39
Tabel 4.9 Hasil pengukuran stabilitas metomil.....	40
Tabel 4.10 Hasil pengukuran orientasi SPE.....	42
Tabel 4.11 Hasil pengukuran kecermatan (akurasi) metomil dalam sampel.....	44
Tabel 4.12 Hasil pengukuran keseksamaan metomil dalam sampel.....	45
Tabel 4.13 Hasil pengukuran uji perolehan kembali dari sampel simulasi.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema ekstraksi sampel simulasi.....	52
Lampiran 2	Skema pemurnian dengan SPE.....	53
Lampiran 3	Skema ekstraksi untuk perolehan kembali dari Sampel simulasi.....	54
Lampiran 4	Skema pemurnian dengan SPE untuk perolehan kembali dari sampel simulasi.....	55
Lampiran 5	Cara perhitungan efisiensi Kolom.....	56
Lampiran 6	Cara perhitungan resolusi (R).....	57
Lampiran 7	Cara perhitungan faktor ikutan (T_f).....	58
Lampiran 8	Cara perhitungan persamaan garis linear (linearitas).....	59
Lampiran 9	Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi.....	60
Lampiran 10	Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi	61
Lampiran 11	Cara perhitungan perolehan kembali (akurasi).....	62
Lampiran 12	Penyaringan sampel buah timun.....	64
Lampiran 13	Hasil ekstraksi sampel buah timun setelah penambahan garam NaCl.....	65
Lampiran 14	Pemurnian sampel dengan SPE Aminopropil.....	67
Lampiran 15	Sampel buah timun organik.....	68
Lampiran 16	Instrumen KCKT.....	69
Lampiran 17	Sertifikat analisis metomil.....	70
Lampiran 18	Sertifikat analisis BDMC.....	71
Lampiran 19	Sertifikat analisis SPE Aminopropil.....	72
Lampiran 20	Sertifikat analisis SPE C-18.....	73

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pertumbuhan jumlah penduduk yang terus meningkat dari tahun ke tahun menyebabkan kebutuhan pangan yang semakin besar. Hal ini menyebabkan komoditi pertanian memiliki peran yang penting dan strategis bagi negara-negara penghasil bahan pangan dalam menambah perolehan devisa negara (Sulistiyo, 2010). Pada era globalisasi saat ini, aspek pelestarian lingkungan hidup dan perlindungan terhadap konsumen telah menjadi isu sentral di berbagai negara. Oleh karena itu komoditas yang telah teruji aman bagi konsumen dan lingkunganlah yang dapat bersaing di pasar internasional. Adanya permintaan kebutuhan pangan yang tinggi tersebut menyebabkan petani berusaha untuk semaksimal mungkin memperbaiki hasil pertanian. Namun para petani seringkali dihadapkan pada gangguan serangga, guma, dan binatang pengerat yang dapat mengganggu kualitas hasil pertanian. Penggunaan pestisida untuk mengatasi masalah hama dan penyakit telah lama diaplikasikan oleh petani, namun pemberantasan hama dengan pestisida dapat mengakibatkan resiko keracunan bagi petani dan konsumen (Komisi Pestisida, 1997; Tarumingkeng, 1992).

Pestisida merupakan bahan kimia, campuran bahan kimia, atau bahan-bahan lain yang bersifat bioaktif. Pestisida yang disemprotkan pada tanaman sebagian besar akan melekat dan menutupi permukaan tanaman (Sudarmo, 1990). Pestisida yang sering digunakan oleh petani adalah pestisida dari golongan karbamat dan pestisida golongan organofosfat. Pestisida metomil dan pestisida karbaril dari golongan pestisida karbamat telah diberhentikan peredarannya karena daya racun akutnya yang tinggi (IPCS, 1996).

Metomil merupakan insektisida berspektrum luas yang bekerja merusak sistem syaraf karena metomil dapat menghambat asetilkolinesterase (AChE). AChE mengendalikan hidrolisis asetilkolin (Ach), yaitu neurotransmitter yang dihasilkan dalam vesikel-vesikel pada akson dekat celah sinaptik. Ach oleh AChE dihidrolisis menjadi kolin. Dalam keadaan tidak terdapat AChE, Ach yang

dihasilkan akan berakumulasi sehingga dapat terjadi gangguan transmisi impuls, yang menyebabkan menurunnya koordinasi otot-otot, konvulsi dan kematian. Pestisida karbamat relatif mudah diurai di lingkungan (tidak persisten) dan tidak terakumulasi oleh jaringan lemak hewan. Metomil merupakan pestisida dengan toksisitas oral akut pada tikus sebesar 17,5 mg/kg dan toksisitas dermal pada kelinci sebesar 5000 mg/kg (Tarumengkeng, 1992).

Tersebarnya residu pestisida pada tanaman mengakibatkan tingginya resiko keracunan pada manusia. Hal ini dikarenakan manusia mengkonsumsi sayur-sayuran dan buah-buahan untuk kebutuhan sehari-hari. Maka dari itu diperlukan metode analisis kuantitatif untuk senyawa pestisida sebagai ukuran untuk menentukan apakah residu pestisida yang ada pada sayur-sayuran dan buah-buahan dari hasil pertanian memiliki tingkat yang aman untuk dikonsumsi.

Pada dasarnya metode analisis residu karbamat dapat dilakukan dengan beberapa cara, misalnya dengan kromatografi gas atau kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor ultraviolet atau detektor fluoresensi. Namun, analisis menggunakan kromatografi gas pada pestisida golongan N-metilkarbamat dapat menyebabkan terjadinya dekomposisi pada senyawa tersebut (Suzanne, 1998).

KCKT merupakan metode pilihan untuk analisis residu karbamat yang dapat dilakukan di dalam makanan maupun analisis di dalam air meskipun sensitivitasnya kurang. Oleh karena itu, untuk meningkatkan sensitivitas tersebut dilakukan derivatisasi dengan menggunakan sistem reaktor pasca kolom (Komisi Pestisida, 1997). Proses derivatisasi melibatkan reaksi kimia antara senyawa yang akan dianalisis dengan senyawa penderivatisasinya untuk mengubah sifat fisika dan kimia dari senyawa yang akan dianalisis (Munson, 1991).

Pada dasarnya residu pestisida yang ada pada buah-buahan atau sayur-sayuran berada dalam jumlah yang kecil. Maka dari itu penggunaan detektor fluoresensi diharapkan dapat mendeteksi residu pestisida dalam jumlah yang sekecil mungkin. Metomil ataupun pestisida dari golongan karbamat lainnya merupakan senyawa yang tidak berfluoresensi. Oleh karena itu perlu direaksikan dengan senyawa fluorogenik agar dapat membentuk konjugasi molekul siklik yang dapat berfluoresensi. Ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol adalah senyawa penderivat yang digunakan untuk membentuk kompleks berfluoresensi dari

pestisida N-metilkarbamat (Munson, 1991; Komisi Pestisida, 1997). Reaksi pasca kolom untuk analisis pestisida dengan KCKT dimulai oleh Moye et al. Penelitian ini menggunakan reaksi amin primer dengan 2-merkaptotanol dan ortoftalaldehid untuk membentuk kompleks berfluoresensi dari pestisida N-metilkarbamat. Karbamat terlebih dahulu dihidrolisis dengan larutan basa kuat (NaOH) pada suhu tinggi pada sistem pasca kolom untuk melepaskan metilamin. Selanjutnya metilamin yang terbentuk akan bergabung dengan ortoftalaldehid dan nukleofilik 2-merkaptotanol untuk membentuk derivat isoindol yang merupakan kompleks berfluoresensi (Waters Corporation, 1996)

1.2. Tujuan Penelitian

- 1.2.1. Memperoleh metode analisis pestisida metomil secara kromatografi cair kinerja tinggi pasca kolom yang valid
- 1.2.2. Memperoleh cara ekstraksi yang lebih baik untuk residu pestisida metomil yang ada dalam buah timun serta mengetahui persentase perolehan kembali hasil ekstraksinya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pestisida Karbamat

Pestisida karbamat merupakan pestisida antikolinesterase yang ditemukan setelah fosfat organik. Saat ini di pasaran terdapat banyak pestisida dari golongan karbamat. Pestisida karbamat adalah derivat dari fisostigmin yang merupakan alkaloid utama dari tanaman *Physostigmina venerosum* (Tarumengkeng, 1992).

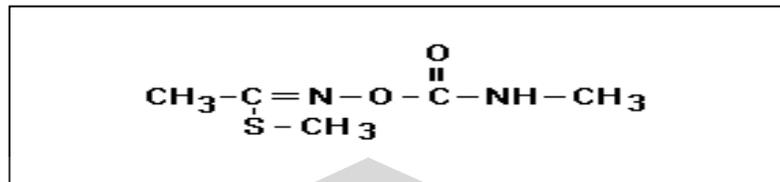
Karbamat bekerja mengikat asetilkolinesterase atau sebagai asetilkolinesterase *inhibitor*. Asetilkolinesterase adalah enzim yang diperlukan untuk menjamin kelangsungan fungsi sistem saraf manusia, vertebrata, dan insekta. Fungsi dari asetilkolinesterase adalah untuk mengatur produksi dan degradasi Ach, suatu neurotransmitter pada sistem saraf otonom (parasimpatis) dan somatik (otot rangka). Tanda-tanda keracunan akut pestisida karbamat timbul setelah 1-12 jam inhalasi atau absorpsi melalui kulit dan prosesnya lebih cepat melalui saluran pencernaan dengan gejala salivasi yang berlebihan, nyeri lambung (kontraksi berlebihan), mual, dan diare. Selain itu asetilkolinesterase dapat juga menimbulkan efek muskarinik berupa bronkokonstriksi dan peningkatan sekresi bronkus. Sedangkan efek nikotiniknya menimbulkan gerakan yang tidak teratur, kontraksi otot (kejang). Gejala klinik yang timbul pada keracunan pestisida karbamat meliputi depresi pernapasan, mulut berbusa, diare, dan depresi jantung karena perangsangan parasimpatis yang berlebihan. Namun, dalam hal ini karbamat lebih selektif dan diskriminatif dalam penghambatan Ach dan efek penghambatan Ach oleh karbamat bersifat dapat terpulihkan (reversible) (Priyanto, 2009).

Karbamat diklasifikasikan menjadi sub-kelompok yaitu : naftil karbamat (karbaril), fenil karbamat (contohnya metiokarb dan propuksur), karbamat pirazol (contohnya dimetilan isolan dan pirolan), karbamat metil heterosiklik (contohnya bendiokarb dan karbofuran), oksim (contohnya aldikarb dan metomil) (Djojsumartio, 2008).

2.1.1. Metomil

a. Identitas (IPCS, 1996)

Struktur Kimia



[Sumber : IPCS, 1996]

Gambar. 2.1 Struktur kimia metomil

Melekul formula	: C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S
Berat Melekul	: 162,2
IUPAC	: <i>S</i> -methyl- <i>N</i> -(methylcarbamoyloxy) thio- acetimidate
CAS	: [Methyl]ethanimidothioate
Sinonim	: Metomil, mesomil, OMS 1196
Nama dagang	: Lannate (Du Pont), flytek (Zoecon), Methomex (Makhteshim), Methomyl (Verious), Pillarmate (Pillar)

b. Karakteristik Fisika Kimia (IPCS, 1996)

Organoleptis : kristal putih, sedikit berbau sulfur

Titik Lebur : 77⁰ C

Kelarutan

Air	54,7 g/liter
Toluen	30 g/liter
Isopropil	220 g/liter
Etanol	420 g/liter
Aseton	720 g/liter
Metanol	1000 g/liter

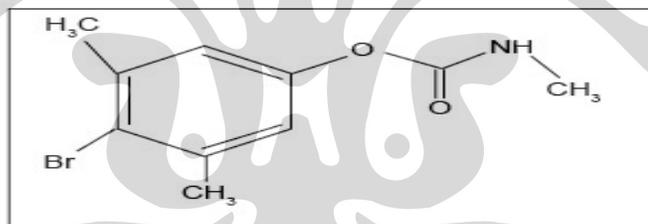
Metomil stabil di bawah sinar matahari dan pada suhu di atas 140°C. Tidak terurai ketika terpapar selama 120 hari. Metomil juga stabil dalam buffer steril pada suhu 25°C (stabil pada pH 5-7 tidak dalam 30 hari) tetapi hal tersebut dapat

meningkatkan penguraian sejalan dengan peningkatan pH dan suhu. Waktu paruhnya di air pada pH 9 adalah 30 hari (IPCS, 1996).

Metomil merupakan insektisida spektrum luas yang membunuh hama dan berfungsi mengontrol kutu dan laba-laba. Metomil digunakan untuk membasmi hama pada sayur-sayuran, buah-buahan dan tanaman lapangan serta dapat mengusir unggas. Metomil efektif dalam dua cara: (a) sebagai kontak insektisida, karena membunuh serangga sasaran pada kontak langsung, dan (b) sebagai insektisida sistemik karena kemampuan untuk menyebabkan keseluruhan sistemik keracunan pada serangga sasaran. Metomil mampu diserap oleh tanaman tanpa menjadi fitotoksik atau berbahaya untuk tanaman tersebut (IPCS, 1996).

Metomil dapat terserap melalui inhalasi dan juga melalui kulit, menghambat asetilkolinesterase plasma lebih cepat dari pada asetilkolinesterase eritrosit. Keracunan terjadi tanpa penundaan dan pada dosis yang rendah karena metabolisme dan ekskresinya tidak terakumulasi dalam jaringan (IPCS, 1996).

2.1.2. BDMC (4-brom-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat)



[Sumber : Waters Coperation, 2009]

Gambar. 2.2 Stuktur kimia BDMC

BDMC merupakan senyawa derivat N-metilkarbamat yang bisa digunakan sebagai baku dalam (*internal standar*) dalam analisis pestisida golongan N-metil karbamat.

2.2. Penyerapan Pestisida dalam Tanaman

Pestisida yang disemprotkan segera bercampur dengan udara dan langsung terpapar sinar matahari. Pestisida dapat mengalami fotodekomposisi di udara, sebagian besar pestisida yang terpapar pada tanaman dapat melekat dan menyebar menutup permukaan tanaman (Sudarmo, 1990).

Pola pergerakan pestisida sistemik dapat menembus melalui folikel, epidermis batang, kulit kayu dan akar. Jalur penyerapan pestisida melalui permukaan tumbuhan sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti sifat pestisida, jenis rumusan, kondisi lingkungan dan sifat biologis tumbuhan. Dalam penembusan struktur internal, pestisida harus melewati kutikula yang menutupi permukaan daun yang terkena udara. Pestisida lipofilik masuk secara relatif cepat melalui komponen *lipoid* kutikula. Kutikula juga dapat dikatakan permeabel terhadap molekul polar. Penerobosan melalui stomata juga dapat menjadi jalur yang efektif bila terbuka pada saat pemakaiannya (Connell, 1995).

Pengambilan pestisida melalui akar dianggap merupakan tempat yang paling penting khususnya dalam zona bulu-bulu akar. Penyerapan pada akar terjadi lebih mudah dengan pestisida yang larut dalam air dibandingkan yang larut dalam lemak. Translokasi pestisida dalam tanaman dapat ke arah atas (akropetal), ke arah bawah (basipetal) atau lateral. Molekul pestisida dapat bergerak dengan cepat dalam tumbuhan, floem dan xilem. Pestisida yang terserap melalui daun cenderung berpindah dalam batang yang berasimilasi yaitu melalui floem, serta berakumulasi dalam bagian yang tumbuh dari tanaman seperti akar dan ujung tanaman. Translokasi pestisida yang terserap oleh akar mencakup pergerakan melalui aliran getah xilem dalam arah arus transpirasi (Connell, 1995).

2.3. Mekanisme Peracunan Pestisida Karbamat

Pestisida masuk dalam tubuh manusia bisa dengan cara sedikit demi sedikit dan mengakibatkan keracunan kronis dan bisa juga berakibat racun akut bila jumlah pestisida yang masuk ke dalam tubuh manusia memiliki jumlah yang cukup banyak. Penderita keracunan akut bisa mengalami kematian (Wudianto, 2006).

Gejala toksisitas golongan karbamat hampir sama dengan gejala keracunan organoposfat. Pada dasarnya toksisitas karbamat dikaitkan dengan ketidakaktifan enzim kolinesterase. Enzim ini memutus neurotransmitter asetilkolin pada sinaps. Karbamat (X-CONHR) dapat mengawali suatu aksi penghalangan dengan ikatan kovalen gugus karbamil pada C elektrofilik (karbamilasi) kepada tempat esterastik kolinesterase membentuk suatu kompleks penghambat-enzim. Kompleks penghambat-enzim selanjutnya terurai, melepaskan gugus X sebagai HX dan meninggalkan enzim terkarbamilasi. Karbamat merupakan penghambat kolinesterase yang reversibel karena enzim aktif dapat diregenerasi dari kompleks penghambat-enzim (Connell, 1995).

2.4. Analisis Kuantitatif Residu Pestisida

Analisis residu N-metilkarbamat secara langsung dengan kromatografi gas dihindari karena bersifat termolabil. KCKT merupakan teknik yang relatif mudah meskipun sensitivitasnya kurang. Untuk meningkatkan sensitivitas, dilakukan derivatisasi pasca-kolom terhadap metilamin (hasil hidrolisis karbamat dalam lingkungan alkalis) dengan ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol menjadi senyawa berfluoresensi, sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluoresensi (Komisi Pestisida, 1997).

2.5. Hidrolisis dan Derivatisasi

Derivatisasi merupakan perlakuan yang sangat penting untuk analisis residu pestisida dengan KCKT (Skoog, 1992). Detektor yang paling banyak digunakan adalah detektor ultraviolet dan fluoresensi sehingga banyak metode yang dikembangkan untuk menambah gugus kromofor yang dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang analisis (Murson, 1991). Tujuan utama pembentukan derivatisasi adalah untuk meningkatkan sensitifitas dan selektifitas (mengurangi bahan pengganggu yang tidak terdeteksi) (Nollet, 1992). Derivatisasi dapat dilakukan dengan pre kolom maupun pasca kolom. Pada derivatisasi pre kolom, senyawa yang akan dianalisis diderivatisasi terlebih dahulu kemudian senyawa dianalisis secara kromatografi. Sedangkan pada derivatisasi paska kolom senyawa

dikromatografi terlebih dahulu kemudian diderivatisasi setelah keluar dari kolom, tetapi sebelum mencapai detector (Munson, 1991).

a. Pre Kolom

Saat ini, derivatisasi pre kolom sudah jarang digunakan. Pada pre kolom derivatisasi dilakukan sebelum kromatografi, untuk membentuk bahan yang terdeteksi UV (memiliki gugus kromofor) atau berfluoresensi. Kondisi yang harus dipenuhi antara lain : (a) Harus mengetahui reaksi stoikiometrinya dan struktur produk yang dihasilkan, (b) Reaksinya harus relatif cepat dengan derivat yang dihasilkan dan stabil dalam larutannya (c) Reagen dan derivatnya harus stabil selama proses kromatografi.

Carbofuran dan dua metabolitnya telah dianalisis dari makanan dengan mereaksikan bahan utama dengan dansil klorida (5 – dimetilaminonaptalen – 1 - sulfonil klorida). Lawrence juga menggunakan desil klorida untuk menderivatisasi karbaril. Sehingga dapat dianalisis dari kentang. sebelumnya desil klorida dikenal tidak berfluoresensi, tetapi jika direaksikan dengan senyawa fluorogenik akan menghasilkan senyawa yang berfluoresensi tinggi. Satu agen fluorensensi yang lain yaitu 9-fluorenil-metilkloroformat, telah digunakan untuk menderivatisasi glifosfat dan metabolitnya dalam strawberi.

Non otomatis merupakan kekurangan yang sangat besar dari derivatisasi pre kolom karena waktu persiapan pembuatannya yang panjang dan hasilnya yang tidak tetap.

b. Pasca Kolom

Derivatisasi pasca kolom terjadi setelah analit terpisah. Awalnya teknik ini memiliki masalah karena pelebaran pita namun sudah teratasi dan menjadi prosedur derivatisasi pilihan untuk residu.

Reaktor pasca kolom dapat diklasifikasikan dalam 4 kelompok :

1. Tubular terbuka

Reaktor ini terdiri dari sebuah pipa (lurus atau gulungan) yang terbuat dari PTFE, gelas, kuarsa atau *stainless steel*. Reaktor tubular biasanya terdiri dari bagian gulungan yang tersambung dari pipa PTFE. Pipa dirancang untuk kecepatan gerak yang cepat (1 menit atau kurang) meskipun pipa tersebut dapat dirancang untuk reaksi yang lambat (beberapa menit).

2. Reaktor packed bed

Reaktor packed bed atau reaktor fase padat terdiri dari bagian yang pendek dari pipa dengan beberapa tipe pembungkusan bahan. Reaktor padat pertama berisi pipa *stainless steel* dengan gelas inert yang menyerap butiran dimana secara keseluruhan dijalankan untuk menghalangi pelebaran pita dengan reaksi selama 0.5 sampai 4 menit. Tipe reaktor akan lebih berguna jika pembungkusan bahan adalah kristal (logam, penukar ion, immobilisasi enzim). Pembungkusan sebenarnya mengambil bagian dari reaksi derivatisasi dimana tidak hanya memotong pelebaran puncak tetapi mengurangi kebutuhan pompa dan reagen yang tidak dapat digunakan lagi.

3. Segmented stream

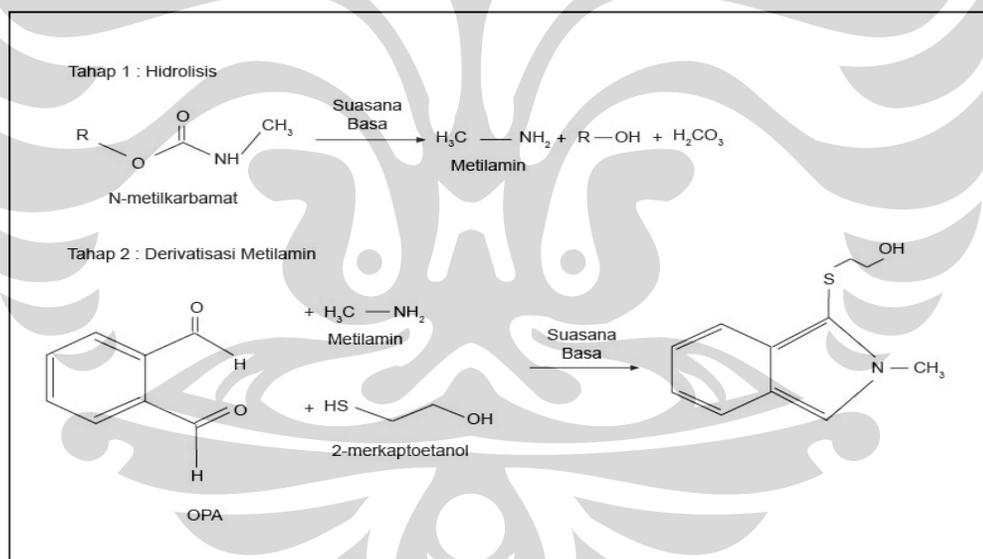
Reaktor ini dirancang untuk analisis aliran kontinue. Awalnya aliran berpotongan dengan udara dan gas lainnya untuk mencegah dispersi sampel yang membutuhkan waktu tinggal. Hal ini juga menunjukkan bahwa aliran dapat dipotong menggunakan pelarut organik *nonmiscible* (tidak homogen). Pada kenyataannya, cairan memberikan sistem yang lebih stabil selama mereka tidak memberi respon seperti fluktuasi kecil pada tekanan, suhu, atau aliran tetapi masih tidak mempengaruhi pelebaran pita hingga 20 menit waktu tinggal. Bagaimanapun, pipa pada tipe dari reaktor ini dapat menurunkan secara drastis pelebaran pita.

4. Membran hollow-fiber

Membran hollow-fiber poros reaktor dan membran hollow fiber yang digunakan untuk mengantarkan reagen, bekerja dengan sebuah pompa dan mencampur awalan serta mengurangi pelebaran pita ekstra kolom.

Pemilihan jenis reaktor ditentukan berdasarkan jenis reaksi yang didapat dalam reaktor. Keseluruhan tipe reaksi tergantung pada ukuran analit. Ada beberapa kelas reaksi yang tersedia dan dapat diletakkan dalam 2 kelompok utama yaitu: psikokimia dan derivatisasi. Reaksi psikokimia terdiri dari elektrokimia dan redoks, hidrolisis, *micellar-enhanced*, fotokimia, interaksi fisika dan *thermo-initiated*. Sedangkan reaksi derivatisasi terdiri dari *ion-pair*, pertukaran ligan dan kompleksasi, dan derivatisasi kimia yang sebenarnya.

Reaksi pasca kolom untuk analisis pestisida dengan KCKT dimulai oleh Moye et al. Penelitian grup ini pertama-tama dengan menggunakan reaksi amin primer dengan 2-merkaptotanol dan ortoftalaldehid untuk membentuk kompleks berfluoresensi dari pestisida N-metilkarbamat. Karbamat dihidrolisis dengan pasca kolom untuk membentuk metilamin, dimana metilamin akan bereaksi dengan 2-merkaptotanol dan ortoftalaldehid untuk membentuk kompleks yang berfluoresensi. Reaksi hidrolisis serta derivatisasi golongan N-Metilkarbamat.



[Sumber : Waters Corporation, 2009]

Gambar 3. Reaksi hidrolisis serta derivatisasi golongan N-metilkarbmat.

2.6. Reaktor Pasca Kolom

Reaktor pasca kolom terdiri dari oven yang terdapat pada RXNTM 1000 *reaction coil* dan CHEXTM untuk menuju oven reaktor pasca kolom. Pada persimpangan pertama yang masuk pada oven reaktor, aliran dari kolom bergabung dengan aliran dari reagen 1 yang juga telah dipanaskan oleh CHEXTM. Kedua aliran ini bercampur dan menuju RXN 1000 *reaction coil* dimana volume *coil* 1 mL dijaga pada suhu konstan untuk menyebabkan terjadinya reaksi. Setelah keluar dari *coil*, aliran segera masuk pada persimpangan dimana aliran akan bergabung dengan reagen 2 sehingga reaksi pasca kolom tahap dua terjadi. Aliran ini meninggalkan oven, lalu didinginkan hingga suhu lingkungan dengan melewatinya pada CHEXTM, kemudian meninggalkan reaktor pasca kolom dan menuju detektor. RXN *coil* terbuat dari politetrafluoroetilen (PTFE) 0,018 inci dengan volume 1000 μ L (Waters Corporation, 1999).

2.7. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.7.1. Teori Dasar

Kromatografi merupakan teknik yang solut atau zat terlarut yang terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi. Hal ini dikarenakan solut-solut melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair membutuhkan penggabungan secara tepat dengan berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Skoog, 1992).

Ada dua jenis pemisahan di dalam KCKT, yaitu elusi isokratik dan elusi gradien. Pemisahan disebut isokratik jika komposisi fase gerak tetap selama pemisahan berlangsung. Sedangkan disebut elusi gradien jika komposisi fase gerak berubah-ubah secara bertahap selama pemisahan berlangsung. Alat KCKT sederhana terdiri dari reservoir eluen, pompa, injektor, kolom dan detektor (Schmidt, 2005).

2.7.2. Kromatografi Partisi

Kromatografi partisi disebut juga kromatografi fase terikat. Kebanyakan fase diam kromatografi ini adalah silika yang dimodifikasi secara kimia atau fase terikat (26). Pada kromatografi partisi terjadi interaksi antara fase gerak dan fase diam yang dibedakan menjadi kromatografi fase normal (NP) dan kromatografi fase terbalik (RP). Perbedaannya terletak pada ratio polaritas dari fase diam dan fase gerak (Schmidt, 2005).

Pada kromatografi partisi fase normal yang digunakan fase diam yang relatif polar dari fase gerak. Fase terikat yang diikatkan pada penyangga umumnya senyawa alkilamin atau alkilnitril. Fase gerak yang digunakan adalah campuran heksana, metilen atau butilen klorida, dan isopropanol. Hal yang harus diingat adalah fase diam alkilnitril tidak boleh digunakan bersamaan dengan fase gerak ataupun cuplikan yang mengandung gugus keton membentuk basa Schiff (Harmita, 2006).

Kromatografi partisi fase terbalik adalah kromatografi yang paling populer yang digunakan pada saat ini. Perbedaan utama antara fase normal dan fase diam adalah relatif kepolaran antara fase diam dan fase gerak dimana pada fase terbalik fase gerak relatif lebih polar daripada fase diam. Fase terikat yang banyak digunakan berupa gugus fungsi oktill atau oktadekil bersama fase gerak yang mengandung air sebagian atau penuh. Dengan memvariasikan rantai hidrokarbon pada fase terikat maka gugus fungsi trimetilsilil, butildimetilsilil, oktadimetilsilil, oktadesildimetilsilil, dan difenilmetilsilil dapat digunakan sebagai fase diam. Fase terbalik digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa nonpolar yang larut dalam hidrokarbon dengan bobot molekul kurang dari 1000. Fase normal digunakan untuk memisahkan senyawa yang polar seperti alkohol dan amina (Harmita, 2006)

2.7.3. Detektor Fluoresensi

Detektor fluoresensi hanya dapat mendeteksi komponen-komponen zat yang dapat berfluoresensi. Kepekaan dan selektifitasnya cukup tinggi karena hanya komponen tertentu yang memberikan respon. Detektor fluoresensi kepekaannya 100 kali lebih peka dari detektor ultraviolet- visibel (Harmita, 2006).

a. Molekul-molekul yang mampu berfluoresensi (Sudjadi, 2007)

Sistem ikatan rangkap terkonjugasi memiliki struktur yang planar dan kaku sehingga akan mampu menyerap secara kuat di daerah 200-800 nm pada radiasi elektromagnetik. Senyawa-senyawa yang mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi ini merupakan calon (kandidat) senyawa yang mampu berfluoresensi. Modifikasi struktur terhadap senyawa-senyawa ini dapat menurunkan atau meningkatkan intensitas fluoresensi, tergantung pada sifat dan letak gugus substituen.

b. Variabel yang Mempengaruhi Fluoresensi (Sudjadi, 2007)

1. Hasil Kuantum (efisiensi kuantum)

Efisiensi kuantum merupakan bilangan yang menyatakan perbandingan antara jumlah molekul yang berfluoresensi terhadap jumlah total molekul yang tereksitasi. Nilai efisiensi kuantum (Φ) yang diharapkan adalah mendekati 1, yang berarti efisiensi fluoresensi sangat tinggi.

2. Pengaruh Kekuatan Struktur

Fluoresensi dapat terjadi dengan baik jika molekul-molekul memiliki struktur yang kaku (*rigid*).

3. Pengaruh Suhu

Bila suhu semakin tinggi maka efisiensi kuantum fluoresensi semakin berkurang. Pada suhu yang lebih tinggi tabrakan-tabrakan antar molekul dengan molekul pelarut menjadi lebih sering, dimana pada peristiwa tabrakan kelebihan energi molekul yang tereksitasi dilepaskan ke molekul pelarut, akibatnya efisiensi kuantum fluoresensi berkurang

4. Pengaruh Pelarut

Jika pelarut semakin polar maka intensitas fluoresensi semakin besar.

5. Pengaruh pH

pH berpengaruh pada letak keseimbangan antara bentuk terionisasi dan bentuk tak terionisasi.

6. Pengaruh Oksigen Terlarut

Adanya gas oksigen akan memperkecil intensitas fluoresensi karena oksidasi senyawa oleh cahaya

7. Pemadaman Sendiri

Pemadaman sendiri disebabkan oleh tabrakan-tabrakan antar molekul zat itu sendiri. Tabrakan-tabrakan itu menyebabkan energi yang tadinya akan dilepaskan sebagai sinar fluoresensi ditransfer ke molekul lain sehingga intensitas berkurang. Penyerapan sendiri terjadi jika panjang gelombang fluoresensi tumpang tindih dengan puncak serapan senyawa yang bersangkutan sehingga intensitas fluoresensi berkurang pada waktu berkas sinar melalui larutan.

2.8. Analisis Kuantitatif dengan KCKT (Johnson, 1991)

Metode kuantitatif dibagi dalam lima langkah. Masing-masing langkah bergantung langsung pada langkah yang mendahuluinya dan kualitas metode ditentukan oleh langkah yang paling lemah. Kelima langkah tersebut antara lain :

1. Pencuplikan (pengambilan sampel)

Pengambilan sampel dapat terjadi sekurang-kurangnya di tiga tempat, yaitu pada saat pengambilan sampel, penyimpanan sampel dan pada praperlakuan sampel.

2. Pemisahan Kromatografi

Pada pemisahan kromatografi, puncak palsu sering timbul selama analisis sehingga sebaiknya kita terlebih dahulu melakukan kromatografi tanpa sampel sebelum penyuntikan sampel.

3. Pengukuran Fisika

Pendeteksian merupakan langkah penting dalam analisis kuantitatif.

4. Pengukuran Sinyal Menjadi Susunan

Proses ini dilakukan dengan menayangkan sinyal detektor pada perekam gaftar-carik. Kemudian susunan ditentukan setelah diperoleh luas puncak atau tinggi puncak baik secara manual maupun melalui proses data komputer.

5. Analisis Statistik

Merupakan suatu proses validasi analisis.

2.9. Teori Kolom (Harmita, 2006)

1. Efisiensi Kolom

Efisiensi kolom menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom diketahui dengan menghitung jumlah plat teori (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan *theoretical plate* (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Yang dimaksud dengan HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom. Kolom dikatakan makin efisien apabila harga HETP makin kecil.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Dimana :

N	=	Jumlah pelat teoritis
HETP	=	Panjang lempeng teoritik
t_R	=	Waktu retensi
W	=	Lebar puncak
L	=	Panjang kolom

2. Resolusi

Resolusi merupakan suatu ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lainnya. Resolusi didefinisikan sebagai jarak (t_R) antara dua puncak dibagi rata-rata lebar (W) dua puncak yang diukur pada alas puncak. Pemisahan dapat dikatakan baik apabila nilai resolusi lebih besar dari 1,5.

$$R = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{W_A + W_B}$$

Dimana :

R	=	Resolusi
t_{RB}	=	Waktu retensi spesi B
t_{RA}	=	Waktu retensi spesi A
W_B	=	Lebar puncak spesi B
W_A	=	Lebar puncak spesi A

2.10. Validasi Metode Analisis (Harmita, 2006 ; Satiadarma, 2004)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Validasi metode diperlukan dalam suatu proses analisis untuk memastikan hasil analisis dapat dipertanggungjawabkan. Suatu metode analisis perlu divalidasi apabila metode tersebut baru dikembangkan untuk suatu permasalahan khusus. Validasi juga dilakukan jika ada revisi dari metode yang sudah ada untuk memecahkan suatu permasalahan analisis yang baru. Selain itu proses validasi juga diperlukan jika diterapkan metode rutin pada laboratorium yang berbeda dengan alat dan oleh analis yang berbeda pula. Seiring dengan berjalannya waktu, proses validasi metode juga perlu dilakukan untuk memastikan bahwa metode tersebut masih dapat diandalkan.

Ada beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis. Untuk menentukan parameter-parameter yang digunakan, perlu diperhatikan tujuan dari penelitian yang akan dilakukan. Parameter yang sering digunakan untuk pengembangan metode analisis antara lain: kecermatan (*accuracy*), keseksamaan (*precision*), selektifitas, linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan (*ruggedness*), serta kekuatan (*robustness*).

1. Kecermatan

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan dilakukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) dan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*).

Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis kemudian sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel placebo (eksipten obat, cairan biologos) kemudian ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

2. Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi sebesar 2% atau kurang. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

3. Selektifitas

Selektifitas suatu metode adalah kemampuan metode tersebut untuk mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektifitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keakuratan dan linearitas yang dapat diterima. Dalam praktik digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50-150 % kadar analit dalam sampel.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai bila nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 tergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{x_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}).

Syarat-syarat dari kelinearan garis yaitu :

- a. Koefisien korelasi
- b. Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), $(r_i)^2$ sekecil mungkin ≈ 0 . r_i diperoleh dari :

$$r_i = y_i - (bx_i + a)$$

- c. Koefisien fungsi regresi (V_{x_0}) $\leq 2.0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5.0\%$ untuk sediaan biologi.
- d. Kepekaan analisis ($\Delta y/\Delta x$)

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_2} \approx \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Sedangkan batas kuantitasi adalah kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui regresi linier dari kurva kalibrasi.

6. Perolehan kembali (*Recovery*)

Perolehan kembali suatu analit adalah perbandingan antara respons detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan ke dan diekstraksi dari sampel dengan respons detektor yang diperoleh dari kadar sebenarnya dari standard murni. Perolehan kembali analit tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan dapat terulang (*reproducible*). Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga rentang kadar (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standar murni yang mewakili perolehan kembali 100%.

2.11. Metode Analisis Residu Pestisida N-Metilkarbamat

1. Aplikasi

a. Karbamat dalam buah-buahan dan sayur-sayuran (Waters Corporation, 2008).

Menggunakan kolom analisis karbamat, 3,9 x 150 mm, laju alir 1,5 mL/menit, volume injeksi 400 μ L, laju reaktor pasca kolom 0,5 mL/menit, detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm. Elusi secara gradien dengan eluen sebagai berikut :

Tabel 2.1. Komposisi fase gerak gradien

Waktu (menit)	Air (%)	Metanol (%)	Asetonitril (%)
0	88	12	0
5.3	88	12	0
5.4	68	16	16
14	68	16	16
16.1	50	25	25
20	50	25	25
22	88	12	0
30	88	12	0

- b. Analisis N-Metilkarbamat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pasca Kolom Menggunakan kolom Pickering Cat. No. 0840250, volume injeksi 10,0 μ L dalam metanol, fase gerak air-metanol (Pickering Laboratories, 2006).

Tabel 2.2 Komposisi fase gerak gradien aplikasi b

Waktu (menit)	Air (%)	Metanol (%)
0	88	12
2	88	12
42	34	66
46	34	66
46.1	0	100
49	0	100

Menggunakan kolom analisis kabamat C-18, 4,6 x 250 mm, temperatur kolom 42⁰C, lajur alir 1,0 mL/menit, volume injeksi 400 μ L, laju reaktor pasca kolom 0,3 mL/menit, detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 330 nm dan emisi 465 nm. Elusi secara gradien dengan eluen sebagai berikut (Pickering Laboratories, 2006) :

Tabel 2.3. Komposisi fase gerak gradien aplikasi c

Waktu	Air	Metanol
-------	-----	---------

(menit)	(%)	(%)
0	100	0
1,1	82	18
36	30	70
39,1	0	100
41,1	100	0
55	100	0

2. SPE (Solid Phase Extraction)

SPE (Solid Phase Extraction) adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. SPE merupakan teknik ekstraksi yang digunakan untuk mengisolasi fase padat atau fase cair dari analit yang berupa larutan. Teknik ini biasanya digunakan untuk pemurnian sampel sebelum dikromatografi atau metode lain untuk analisis kuantitatif analit dalam sampel. SPE dapat digunakan untuk mengisolasi/menarik analit dari variasi matriks yang bermacam-macam, termasuk urin, darah, sampel air, minuman, tanah, jaringan hewan dan produk makanan .

SPE menggunakan afinitas zat terlarut atau tergantung cairan (dikenal sebagai fase gerak) selama melewati fase padat dimana sampel akan tertahan (dikenal sebagai fase diam) untuk memisahkan campuran menjadi komponen yang diinginkan dan tidak diinginkan. Hasilnya adalah bahwa analit yang diinginkan akan tertarik dan pengotor yang tidak diinginkan dalam sampel akan tertahan pada fase diam.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Lingkungan, Departemen Kesehatan Lingkungan, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia dalam kurun waktu Februari-Mei 2010.

3.2. Alat

Seperangkat alat KCKT Waters 2695 yang terdiri dari kolom dimetiloktadesilsilil (Waters *Carbamate Column* 3,9 x 150 mm), pompa reagen pasca kolom (Waters *Reagen Manager*), reaktor pasca kolom (Waters *Post-Column Reaction Module*), pengatur suhu reaktor (Waters *Temperature Control System*), detektor fluoresensi (Waters 2475), dan rekorder.

Penyaring fase gerak 0,45 μm (Waters & Gelman); Vial (Waters Screw Neck Vial 12 x 13 mm PTFE/silicone septa); SPE Aminopropil (Waters *sep-pak aminopropyl cartridges*); SPE C-18 (Waters *sep-pak C-18 cartridges*); PTFE (Waters 4 mm 0,45 μm); Pipet eppendorf 1000 μL ; Kertas saring (Whatman); Timbangan analitik (And GR-200); Ultrasonik (Bronson 1510); Pompa vakum; Pengaduk magnetik (sybron); Aluminium foil, Botol coklat bertutup dan alat-alat gelas.

3.3. Bahan

Standar Metomil 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Accu Standard[®], USA); Baku dalam 4-bromo-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat (Supelco, USA); Sampel timun organik (Real organik, Indonesia); Asetonitril *gradient grade for liquid chromatography* (Merck, Jerman); Aquabidest (Ika Pharmindo, Indonesia); Metanol *gradient grade for liquid chromatography* (Merck, Jerman); Kalium dihidrogen sitrat (Sigma Aldrich, Jerman); Natrium tiosulfat pentahidrat (Merck, Jerman); Natrium hidroksida (Merck, Jerman); Natrium Klorida (Merck, Jerman); Diklormetan *gradient grade for liquid chromatography* (Merck, Jerman); Ortoftalaldehid 97 % (Sigma, Austria); 2-Merkaptoetanol *for synthesis* (Merck, Jerman).

3.3.1. Stok Dapar Borat (0,05 Natrium Borat)

Sejumlah 19,1 gram natrium tetraborat dekahidrat ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam gelas beker dan dilarutkan dengan aquabidest hingga 1 L dengan pengaduk magnetik. Larutan stok ini dapat disimpan dalam botol tertutup rapat dalam jangka waktu 3 bulan setelah pembuatan.

3.3.2. Reagen Ortoftalaldehid.

Sejumlah 50,03 mg ortoftalaldehid ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam gelas beker, dilarutkan dengan 5 mL metanol secara perlahan hingga ortoftalaldehid larut, lalu dipindahkan ke dalam labu ukur 500,0 mL. Stok dapar borat ditambahkan sampai tanda batas dan dicampurkan dengan seksama. Larutan disaring dengan penyaring membran (0.45 μm), lalu dihilangkan oksigennya menggunakan ultrasonik selama lebih kurang 15 menit. Kemudian ditambahkan 500,0 μL 2-merkaptotanol dan putar perlahan agar bercampur dengan baik. Dipindahkan larutan ke dalam reservoir pelarut wadah gelas tertutup, dibungkus dengan aluminium foil untuk melindungi dari cahaya. Selama pengerjaan reagen ortoftalaldehid dilakukan ditempat yang pencahayaannya kurang. Larutan ini harus selalu dibuat baru sebelum analisis dilakukan.

3.3.3. Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 0,05 N

Sejumlah 1,1731 gram NaOH ditimbang dengan seksama, dimasukkan ke dalam gelas beker, dilarutkan dengan aquabidest hingga 500 mL, kemudian aduk hingga homogen dengan pengaduk magnetik. Larutan disaring dengan menggunakan membran filter (0.45 μm), kemudian dihilangkan oksigennya. Larutan natrium hidroksida harus selalu dibuat baru sebelum analisis dilakukan.

3.3.4. Larutan Kalium Dihidrogen Sitrat.

Sejumlah 9,35 g kalium dihidrogen sitrat dan 200,12 mg natrium tiosulfat pentahidrat ditimbang dengan seksama. Kedua bahan kemudian dicampurkan dan dilarutkan dalam aquabidest hingga 1 L. Larutan ini digunakan untuk pengenceran larutan stok standar metomil dan baku dalam BDMC.

3.3.5. Fase Gerak

Fase gerak air disaring dengan penyaring membran organik (0,45 μm) menggunakan pompa vakum dan dihilangkan oksigennya menggunakan ultrasonik selama lebih kurang 15 menit. Untuk fase gerak Metanol dan Asetonitril digunakan penyaring membran anorganik (0,45 μm).

3.4. Cara Kerja

3.4.1. Pembuatan Larutan Stok

3.4.1.1. Larutan Stok Standar Metomil 1,006 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Larutan standar metomil dengan konsentrasi 100,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sejumlah 100,0 μL , dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas, maka didapatkan larutan stok metomil dengan konsentrasi 1,006 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Larutan stok disimpan dalam botol coklat, kemudian ditutup rapat sehingga terhindar dari kelembaban dan udara, ditempatkan dalam lemari pendingin pada suhu $<-10^{\circ}\text{C}$. Dilakukan pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

3.4.1.2. Larutan Stok Baku Dalam 4-brom-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat (BDMC) 109,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Sejumlah lebih kurang 10,90 mg BDMC ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan asetonitril sampai tanda batas, didapatkan larutan stok baku dalam BDMC dengan konsentrasi 109,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Larutan stok disimpan dalam botol coklat, dan ditutup rapat sehingga terhindar dari kelembaban dan udara, ditempatkan dalam lemari pendingin pada suhu $<-10^{\circ}\text{C}$. Dilakukan pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

3.4.2. Kondisi Analisis Optimum

Larutan campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL sebanyak 100,0 μ L disuntikkan ke dalam KCKT dengan menggunakan fase gerak gradien sesuai komposisi pada tabel 1. Kecepatan alir yang digunakan 1,5 mL/menit, suhu kolom 30⁰C, suhu reaktor pasca kolom 80⁰C, kecepatan alir reagen pasca kolom masing-masing 0,5 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 399 nm dan emisi 445 nm.

3.4.3. Uji Kesesuaian Sistem

Campuran larutan standar metomil dengan konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 109,0 ng/mL disuntikkan sebanyak 100,0 μ L ke dalam KCKT dengan elusi secara gradien menggunakan fase gerak air-metanol-asetonitril dengan komposisi tertera pada tabel 1. Kecepatan alir yang digunakan 1,5 mL/menit, suhu kolom 30⁰C, suhu reaktor pasca kolom 80⁰C, kecepatan alir reagen pasca kolom masing-masing 0,5 mL/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 399 nm dan emisi 445 nm. Prosedur diulangi sebanyak lima kali. Kemudian dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan efisiensi kolom (N dan HETP), faktor ikutan (T_f), resolusi (R), dan koefisien variasi keterulangan.

3.4.4. Uji Linearitas

Campuran larutan standar metomil dengan konsentrasi 10,06; 20,12; 40,24; 60,36; 80,48 dan 100,60 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 109,0 ng/mL disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Perbandingan luas puncak yang diperoleh dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya antara PAR dan konsentrasi, lalu dihitung koefisien korelasinya (r) serta harga LOD dan LOQ.

3.4.5. Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi)

Campuran larutan standar metomil dengan konsentrasi 20,12 ; 60,36 ; 100,60 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak enam kali. Dari perbandingan luas puncak yang diperoleh, dihitung simpangan baku relatif (koevisien variasi). Konsentrasi larutan standar metomil dihitung dengan

menggunakan kurva kalibrasi standar, lalu dihitung perolehan kembalinya dan % diffnya.

3.4.6. Uji Stabilitas

Campuran larutan standar metomil dengan konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 109,0 ng/mL disuntikkan sebanyak 100,0 μ L ke dalam KCKT dengan frekuensi penyuntikan masing-masing tiga kali. Larutan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu $\leq -10^{\circ}\text{C}$. Prosedur diulangi pada hari keempat belas dan kedua puluh delapan dengan frekuensi penyuntikan masing-masing tiga kali. Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncak dan menghitung simpangan baku relatif (koefisien variasi).

3.4.7. Orientasi SPE

3.4.7.1. Sampel Buah Timun

Sampel buah timun adalah buah timun organik dengan nama dagang Real Organic yang memiliki sertifikat bebas bahan kimia dan bebas pestisida, sampel buah timun dicuci bersih dengan aquadest dan dikeringkan, bagian yang digunakan adalah bagian kulit dan daging buah sesuai dengan jumlah yang diinginkan.

3.4.7.2. Proses Ekstraksi Sampel dan Pemurnian dengan SPE

Sejumlah lebih kurang 25,0051 gram dan 25,0730 gram buah timun organik ditambahkan masing-masing 50 mL asetonitril, dihomogenkan selama 2-5 menit, dan disaring. Sejumlah 50 mL filtrat yang didapat masing-masing dimasukkan ke dalam corong pisah. Larutan standar metomil konsentrasi 804,80 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 872,00 ng/mL ditambahkan masing-masing sebanyak 250,0 μ L, lalu ditambahkan juga 5,0043 gram dan 5,0224 gram NaCl masing-masing ke dalam corong pisah, dikocok kuat selama 1 menit dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Sejumlah 10,0 mL lapisan asetonitril (atas) diambil dan diuapkan hingga kering (80°C). Kemudian masing-masing direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol-diklormetan=(1:99). Selanjutnya kedua sampel disebut sebagai sampel A.

Sejumlah 4,0 mL metanol-diklormetan=(1:99) dilewatkan pada SPE Amionopropil dan SPE C-18, kemudian sejumlah 2,0 mL larutan sampel A dilewatkan pada SPE Aminopropil dan SPE C-18, Larutan yang telah melewati SPE dibuang. Sejumlah 2,0 mL larutan metanol-diklormetan=(1:99) sebanyak 12 kali secara berturut-turut dilewatkan pada SPE Aminopropil dan SPE C-18, larutan yang telah dilewatkan pada SPE Aminopropil dan SPE C-18 dikumpulkan. Larutan diuapkan hingga kering (50°C), direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol, disaring dengan PTFE dan dimasukkan ke dalam vial. Sampel disuntikkan ke dalam KCKT. Kemudian dihitung PAR yang dihasilkan.

3.4.8. Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi) dari Sampel

Sejumlah lebih kurang 25,1324 gram buah timun ditambahkan 50 mL asetonitril, dihomogenkan selama 2-5 menit, dan disaring. Sejumlah 50 mL filtrat yang didapat dimasukkan ke dalam corong pisah. Larutan standar metomil konsentrasi 804,80 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 872,0 ng/mL ditambahkan ke dalam filtrat sampel buah timun masing-masing sebanyak 100,0; 150,0; dan 250,0 μL untuk metomil dan 250,0 μL untuk BDMC, lalu ditambahkan juga 5,0224 g NaCl, dikocok kuat selama 1 menit dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Sejumlah 10,0 mL lapisan asetonitril (atas) diambil dan diuapkan hingga kering (80°C), kemudian direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol-diklormetan=(1:99). Selanjutnya disebut sebagai Sampel A.

Sejumlah 4,0 mL metanol-diklormetan=(1:99) dilewatkan pada SPE Amionopropil, kemudian sejumlah 2,0 mL larutan sampel A dilewatkan pada SPE Aminopropil, Larutan yang telah melewati SPE dibuang. Sejumlah 2,0 mL larutan metanol-diklormetan=(1:99) sebanyak 12 kali secara berturut-turut dilewatkan pada SPE Aminopropil dan larutan yang telah dilewatkan pada SPE Aminopropil dikumpulkan. Larutan diuapkan hingga kering (50°C), direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol, disaring dengan PTFE dan dimasukkan ke dalam vial. Sampel disuntikkan ke dalam KCKT. Penyuntikan diulangi masing-masing sebanyak enam kali. Dari perbandingan luas puncak yang diperoleh, dihitung simpangan baku relatif (koefisien variasinya). Konsentrasi larutan standar metomil dihitung

dengan menggunakan kurva kalibrasi standar, lalu dihitung perolehan kembali dan % diffnya.

3.4.9. Uji Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi

Sejumlah lebih kurang 25,0265 gram sampel buah timun ditambahkan 50 mL asetonitril dan dihomogenkan selama 2-5 menit kemudian disaring. Sejumlah 50 mL filtrat yang didapat dimasukkan ke dalam corong pisah. Larutan standar metomid dengan konsentrasi 804,80 ng/mL ditambahkan kedalam filtrat sampel buah timun sebanyak 250,0 μ L, lalu ditambahkan juga 5,0231 g NaCl, dikocok kuat selama 1 menit dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Sejumlah 10,0 mL lapisan asetonitril (atas) diambil dan diuapkan hingga kering pada suhu 80⁰C, kemudian direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol-diklorometan=(1:99). Selanjutnya disebut sebagai Sampel B.

Sejumlah 4,0 mL metanol-diklorometan=(1:99) dilewatkan pada SPE Amionopropil, sejumlah 2,0 mL larutan sampel B dilewatkan pada SPE Aminopropil, kemudian larutan yang telah melewati SPE dibuang. Sejumlah 2,0 mL larutan metanol-diklorometan=(1:99) sebanyak 12 kali secara berturut-turut dilewatkan pada SPE Aminopropil dan larutan yang telah dilewatkan pada SPE Aminopropil dikumpulkan. Larutan diuapkan hingga kering (50⁰C), direkonstitusi dengan 1,75 mL metanol dan ditambahkan larutan baku dalam BDMC konsentrasi 872,00 ng/mL, disaring dengan PTFE dan dimasukkan ke dalam vial. Sampel disuntikkan ke dalam KCKT. Hitung PAR yang dihasilkan dan perolehan kembali dari standar yang didapat.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pembuatan Larutan Standar

4.1.1 Larutan Stok Metomil 1,006 µg/mL

Larutan standar metomil dengan konsentrasi 100,6 µg/mL dalam sediaan ampul dipipet sejumlah 100,0 µL dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL, dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas, sehingga didapatkan larutan stok standar metomil 1,006 µg/mL. Sejumlah tertentu larutan stok metomil ditambahkan larutan kalium dihidrogen sitrat untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Kemudian larutan stok ini digunakan untuk pengukuran uji kesesuaian sistem dan pengukuran parameter-parameter validasi seperti uji linearitas, pengukuran LOD dan LOQ, uji akurasi dan presisi. Larutan stok disimpan didalam botol coklat yang tertutup rapat untuk menghindari kontaminasi dan disimpan di dalam lemari pendingin dengan suhu rendah -10°C serta terhindar dari sinar matahari langsung. Kondisi penyimpanan pestisida pada suhu rendah dikarenakan untuk memperlambat degradasi pestisida oleh peruraian enzimatik (Komisi Pestisida, 1997).

4.1.2 Larutan Stok Baku Dalam 4-brom-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat (BDMC) 109,0 µg/mL

Baku dalam BDMC ditimbang sejumlah 10,90 mg secara seksama dan dilarutkan dengan asetonitril dalam labu ukur 100 mL sehingga didapatkan larutan stok BDMC dengan konsentrasi 109,0 µg/mL. Larutan stok BDMC disimpan didalam botol coklat yang tertutup rapat untuk menghindari kontaminasi dan disimpan didalam lemari pendingin pada suhu -10°C. Larutan stok BDMC ditambahkan larutan kalium dihidrogen sitrat untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Larutan baku dalam ditambahkan ke dalam standar digunakan untuk meningkatkan ketelitian.

4.2. Kondisi Analisis Optimum

Kondisi analisis pada penelitian ini berdasarkan metode EPA (Environmental Protection Agency) yaitu menggunakan KCKT dengan elusi fase gerak air-metanol-asetonitril yang dielusi secara gradien dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit. Suhu kolom 30°C dan suhu reaktor pasca kolom 80°C (suhu berlangsungnya reaksi hidrolisis dan derivatisasi dari metomil). Kecepatan alir reagen pasca kolom (NaOH dan OPA) masing-masing 0,5 mL/menit dan dengan menggunakan detektor fluoresen pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm dengan volume penyuntikan 100,0 µL. Komposisi fase gerak gradien dapat dilihat pada tabel berikut ini :

Tabel 4.4 Komposisi fase gerak gradien

Waktu (menit)	Laju Alir (mL/menit)	Komposisi Fase Gerak			Kurva Gradien
		Air (%)	Metanol (%)	Asetonitril (%)	
0	1,5	88	12	0	-
5,3	1,5	88	12	0	1
5,4	1,5	68	16	16	5
14	1,5	68	16	16	3
16,1	1,5	50	25	25	7
20	1,5	50	25	25	6
22	1,5	88	12	0	5
30	1,5	88	12	0	1

Pada dasarnya analisis residu N-metilkarbamat dapat dilakukan dengan kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi, namun untuk analisis dengan kromatografi gas dapat menyebabkan terjadinya dekomposisi pada senyawa tersebut. KCKT merupakan metode analisis yang relatif mudah meskipun sensitivitasnya kurang. Untuk meningkatkan sensitivitas dilakukan derivatisasi pasca kolom terhadap metilamin dengan ortoftalaldehida dan 2-merkaptotanol menjadi senyawa berfluoresensi sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluoresensi (Komisi Pesticida, 1997; Suzanne, 1998).

Teknik pasca kolom dilakukan untuk meningkatkan sensitifitas karena jika analisis menggunakan teknik pre kolom dikhawatirkan ada senyawa lain yang bereaksi dengan senyawa penderivat yang digunakan. Ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol adalah senyawa penderivat yang digunakan pada penelitian ini. Namun kedua senyawa penderivat ini biasa digunakan untuk derivatisasi senyawa amin primer. Golongan N-metilkarbamat hanya memiliki gugus amin sekunder. Maka dari itu perlu dilakukan hidrolisis untuk memperoleh gugus amin primer. Natrium hidroksida adalah senyawa yang dipilih untuk menghidrolisis amin sekunder dari golongan N-metilkarbamat. Natrium hidroksida encer merupakan senyawa yang biasa digunakan untuk hidrolisis ester, reaksi ini berlangsung irreversibel. Metilamin yang dilepaskan dari metomil akan bereaksi dengan ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol sehingga menghasilkan senyawa turunan isoindol yang dapat berfluoresensi kuat. Penggunaan detektor fluoresensi diharapkan dapat mendeteksi residu pestisida dalam sayur-sayuran dan buah-buahan hingga jumlah yang sekecil mungkin.

Kolom yang digunakan adalah kolom fase terbalik yaitu dimetiloktadesilsilil. Kolom ini merupakan kolom yang ditujukan khusus untuk analisis senyawa karbamat. Metomil merupakan senyawa yang cukup polar dimana kelarutannya di dalam air adalah 54 g/L sehingga tidak tertahan cukup lama di dalam kolom dibandingkan dengan senyawa karbamat lainnya (Tarumingkeng, 1992).

Pada penelitian ini digunakan campuran air-metanol-asetonitril sebagai fase gerak yang bertujuan untuk memperoleh tingkat polaritas yang bervariasi. Selain itu polaritas dari senyawa-senyawa pestisida derivat N-metilkarbamat juga sangat berdekatan sehingga diharapkan komposisi fase gerak yang dipilih dapat memisahkan beberapa senyawa derivat N-metilkarbamat tersebut.

4.3. Uji Kesesuaian Sistem

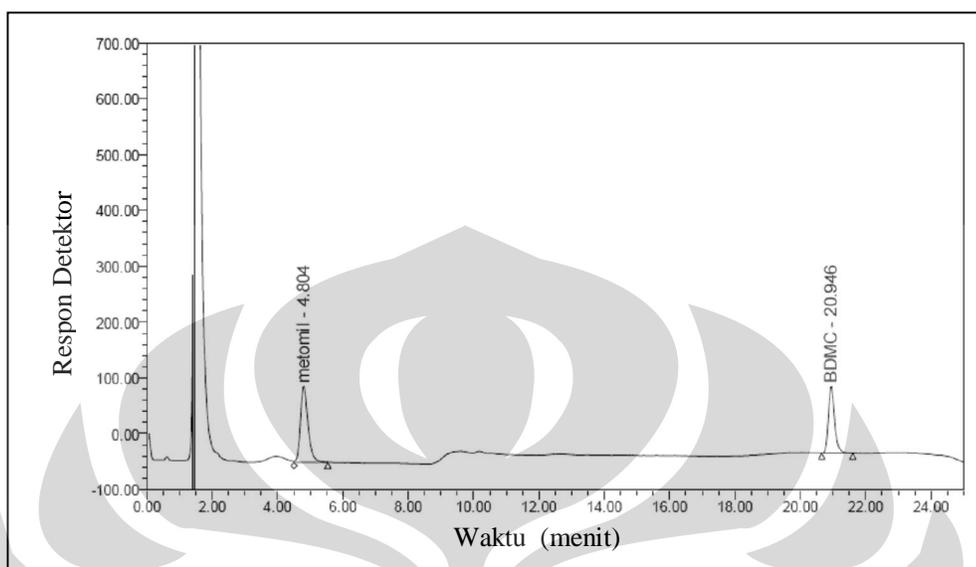
Uji kesesuaian sistem dilakukan agar metode ini dapat digunakan dalam menganalisis komponen-komponen dalam sampel dan menganalisis komponen yang akan dipisahkan. Parameter-parameter dari kesesuaian sistem yaitu efisiensi kolom (Pelat Teoritis (N) dan HETP), Faktor ikutan (T_r) dan Resolusi (R). Kondisi yang optimal ditentukan berdasarkan kondisi analisis yang memberikan nilai N yang besar

sehingga HETP yang dihasilkan rendah dimana keadaan kromatografi memiliki harga N yang lebih besar dari 2000, faktor ikutan (T_r) kurang dari 2 dan resolusi (R) lebih dari 2 (Linda, 1994). Berdasarkan kromatogram yang diperoleh terlihat bahwa pemisahan antara standar metomil dan baku dalam BDMC cukup baik untuk analisis, dimana standar metomil memiliki waktu retensi 4,084 menit dan baku dalam BDMC memiliki waktu retensi 20,946 menit. Dari penyuntikan standar metomil 100,6 ng/mL dan baku dalam BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL sebanyak lima kali penyuntikan, diperoleh nilai N yang lebih dari 2000 dengan faktor ikutan yang diperoleh kurang dari 2 dan resolusi lebih dari 2. Jumlah pelat teoritis (N) yang lebih dari 2000, HETP yang semakin kecil menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak yang sempit dan efisiensi pemisahan komponen-komponen yang terelusi sehingga metode yang digunakan telah teruji efektif untuk analisis. Data selengkapnya adalah sebagai berikut :

Tabel 4.5. Hasil pengukuran kesesuaian sistem

Konsentrasi (ng/mL) [X]	Metomil			BDMC			Resolusi
	N(Pelat)	HETP	Faktor Ikutan	N(Pelat)	HETP	Faktor ikutan	
100,6	2.295,32	0,000065	0,4166	34.642,30	0,000043	0,5	37,99
	2.307,84	0,000064	0,4166	34.642,30	0,000043	0,5	37,96
	3.077,39	0,000048	0,4166	34.685,33	0,000043	0,5	40,24
	3.014,32	0,000049	0,4166	34.665,47	0,000043	0,5	40,35
	3.116,82	0,000048	0,4166	34.672,09	0,000043	0,5	40,16

Kromatogram campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL adalah sebagai berikut :



Gambar 4.4. Kromatogram campuran standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL.

4.4.Uji Linearitas

Tahap pertama yang dilakukan untuk validasi metode analisis adalah membuat kurva kalibrasi. Kemudian dilakukan uji linearitas, serta batas deteksi dan batas kuantitasi yang dapat ditentukan dari hasil kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi terdiri dari enam seri konsentrasi metomil yaitu 10,06; 20,12; 40,24; 60,36; 80,48 dan 100,60 ng/mL. Berdasarkan perhitungan secara statistik diperoleh persamaan kurva kalibrasi yaitu $Y = 0,0060 + 0,0143X$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,9997. Harga koefisien korelasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa dalam rentang konsentrasi yang digunakan diperoleh suatu korelasi yang linear antara konsentrasi dengan perbandingan luas puncak (PAR). Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Selain koefisien korelasi, parameter yang digunakan untuk mengetahui linearitas kurva kalibrasi yaitu koefisien variasi fungsi regresi (V_{xo}). Koefisien variasi fungsi regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi adalah 1,730 % . Harga koefisien variasi fungsi regresi yang

kurang dari 2% menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang digunakan diperoleh linearitas yang baik.

Persamaan regresi linear kurva kalibrasi metomil dapat juga ditentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Limit deteksi dan kuantitasi merupakan parameter analisis yang penting untuk mengetahui batas terendah konsentrasi suatu analit yang masih dapat ditentukan dengan metode yang digunakan secara akurat dan presisi. Semakin kecil limit deteksi dan kuantitasi menunjukkan bahwa metode yang digunakan semakin sensitif. Berdasarkan perhitungan secara statistik diperoleh LOD dan LOQ yang cukup rendah yaitu berturut-turut sebesar 2,73 ng/mL dan 9,10 ng/mL. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan dapat menganalisis zat dalam kadar yang sangat rendah. Data pengukuran kurva kalibrasi metomil dan kromatogram pengukuran LOD metomil sebagai berikut :

Tabel 4.6 Hasil pengukuran kurva kalibrasi metomil

Konsentrasi (ng/mL) [x]	Luas Puncak		PAR [y]	PAR terukur [ŷ]	$\frac{\Delta y}{\Delta x}$	$(y - \hat{y})^2$
	Metomil	BDMC				
10,06	224.725	1.572.977	0,1428	0,1558	0,0143	$3,7 \cdot 10^{-5}$
20,12	449.72	1.511.664	0,2974	0,2917	0,0155	$3,0 \cdot 10^{-5}$
40,24	913.411	1.567.142	0,5829	0,5814	0,0143	$2,4 \cdot 10^{-5}$
60,36	1.470.246	1.714.772	0,8574	0,8691	0,0137	$4,2 \cdot 10^{-5}$
80,48	1.861.370	1.588.398	1,1718	1,1568	0,0157	$48 \cdot 10^{-5}$
100,60	2.269.282	1.588.574	1,4285	1,4445	0,0128	$5,5 \cdot 10^{-5}$
X = 51,98					$\Sigma = 6,8 \cdot 10^{-4}$	

Diperoleh persamaan regresi linear : $y = 0,006 + 0,0143X$

$$r = 0,9997$$

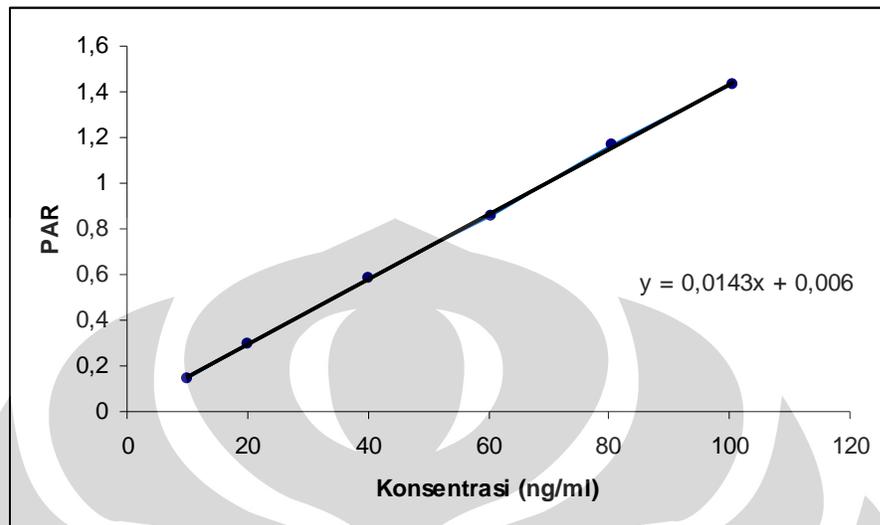
$$X = 51,66 \text{ ng/mL}$$

$$S_{x0} = 0,9019$$

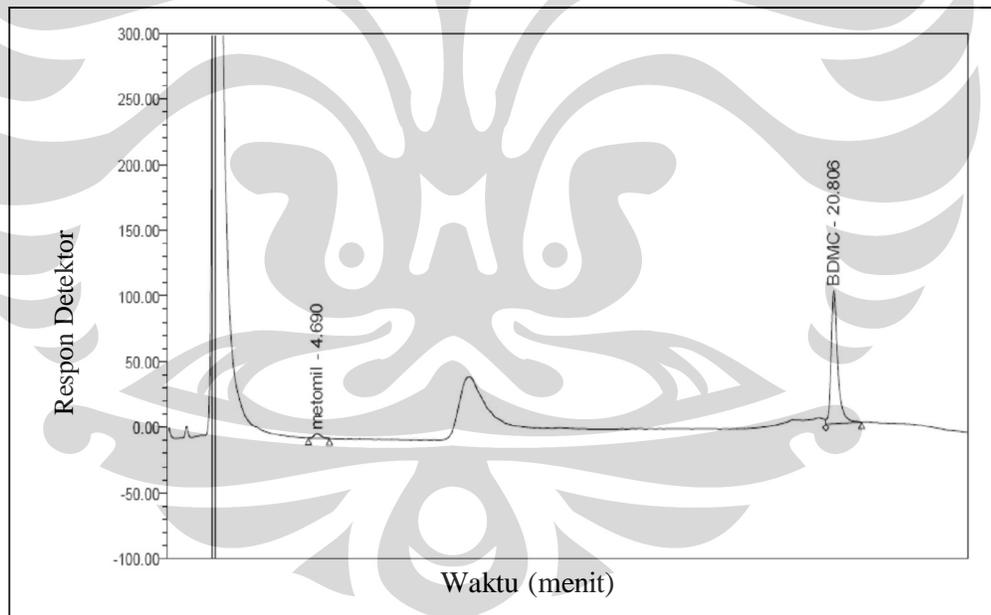
$$V_{x0} = 1,73 \%$$

$$\text{LOD} = 2,73 \text{ ng/mL}$$

$$\text{LOQ} = 9,10 \text{ ng/mL}$$



Gambar 4.5. Kurva kalibrasi metomil



Gambar 4.6. Kromatogram LOD standar metomil konsentrasi 2,01 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL.

4.5. Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi)

Akurasi merupakan suatu metode analisis yang menggambarkan kedekatan rata-rata hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Uji ini dilihat melalui parameter perolehan kembali. Pada uji akurasi dan presisi digunakan tiga tingkat konsentrasi yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Konsentrasi rendah yang digunakan adalah 20,12 ng/mL, konsentrasi sedang yaitu 60,36 ng/mL dan konsentrasi tinggi yaitu 100,60 ng/mL dengan jumlah penyuntikan sebanyak enam kali dari masing-masing konsentrasi. Hasil rata-rata uji perolehan kembali dengan konsentrasi sebesar 20,12; 60,36 dan 100,60 ng/mL berturut-turut antara lain 100,14 ; 99,17 ; 100,13%. Hasil uji perolehan kembali yang dilakukan menggambarkan terdapat derajat kedekatan hasil analit yang sesungguhnya karena semua hasil uji akurasi yang diperoleh memberikan nilai perolehan kembali yang berada pada rentang $100 \pm 2\%$.

Uji Presisi dilakukan sebagai ukuran keterulangan metode analisis. Uji keterulangan dilakukan pada tiga tingkatan konsentrasi yaitu konsentrasi rendah 20,12 ng/mL, konsentrasi sedang 60,36 ng/mL dan konsentrasi tinggi 100,6 ng/mL dengan jumlah penyuntikan enam kali dari masing-masing konsentrasi. Uji presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (koefisien variasi) kurang dari 2%. Hasil uji presisi dari tiga tingkatan konsentrasi 20,12; 60,36; dan 100,6 ng/mL memberikan harga koefisien variasi (KV) berturut-turut 0,51; 0,52 dan 0,62%, semua hasil uji presisi memberikan kriteria seksama karena nilai koefisien variasi dibawah 2%. Data selengkapnya sebagai berikut :

Tabel 4.7. Hasil pengukuran kecermatan (akurasi) metomil

Konsentrasi (ng/mL) [x]	PAR [y]	PAR Rata-rata [\hat{y}]	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	% diff	UPK (%)	UPK Rata-rata (%)
20,12	0,2914	0,2941	19,9580	20,1508	-0,805	99,19	100,14
	0,2945		20,1748		0,272	100,27	
	0,2936		20,1118		-0,041	99,95	
	0,2922		20,0139		-0,527	99,47	
	0,2981		20,4365		1,573	101,57	
	0,2950		20,2098		0,446	100,44	
60,36	0,8724	0,8668	60,5874	60,5337	0,376	100,15	99,17
	0,8644		60,0279		-0,550	100,05	
	0,8660		60,1398		-0,365	100,24	
	0,8638		60,9860		1,037	99,73	
	0,8616		60,8321		0,782	99,98	
	0,8724		60,5874		0,376	100,99	
100,60	1,4506	1,4456	101,0209	100,7377	0,418	100,42	100,13
	1,4525		101,1538		0,550	100,55	
	1,4500		100,9790		0,377	100,36	
	1,4497		100,9580		0,356	100,34	
	1,4285		99,4755		-1,118	98,87	
	1,4480		100,8391		0,238	100,24	

Tabel 4.8. Hasil pengukuran keseksamaan (presisi) metomil

Konsentrasi (ng/ml) [x]	PAR [y]	PAR Rata-rata [\hat{y}]	SD	KV (%)
20,12	0,2914	0,2930	0,0015	0,5119
	0,2945			
	0,2936			
	0,2922			
	0,2918			
	0,2950			
60,36	0,8724	0,8668	0,0045	0,5286
	0,8644			
	0,8660			
	0,8638			
	0,8616			
	0,8724			
100,60	1,4506	1,4456	0,0089	0,6194
	1,4525			
	1,4500			
	1,4497			
	1,4285			
	1,4480			

4.6. Uji Stabilitas

Uji Stabilitas dilakukan untuk melihat kestabilan larutan standar metomil dan BDMC selama penyimpanan dalam larutan stok pada rentang waktu tertentu. Kondisi yang digunakan dalam pengujian stabilitas harus mencerminkan situasi yang akan dialami selama penanganan sampel dan analisis sesungguhnya. Uji stabilitas standar metomil dilakukan pada hari ke nol, hari keempat belas dan hari kedua puluh delapan. Konsentrasi metomil yang digunakan untuk uji stabilitas adalah sebesar 100,6 ng/mL dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL dengan penyuntikan sebanyak tiga kali.

Hasil analisis menunjukkan pada hari nol nilai koefisien variasi (KV) sebesar 0,39% ; pada hari keempat belas nilai koefisien variasi sebesar 0,41% dan pada hari ke dua puluh delapan sebesar 0,34%. Berdasarkan parameter koefisien variasi yang diperoleh menunjukkan bahwa larutan standar metomil dan BDMC bersifat relatif stabil karena nilai koefisien variasi yang diperoleh memberikan nilai dibawah 2% sehingga dapat dikatakan larutan standar metomil dapat digunakan untuk analisis karena bersifat stabil selama penyimpanan dua puluh delapan hari. Data pengukuran stabilitas metomil selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.9. Hasil pengukuran stabilitas metomil

Konsentrasi (ng/mL)	PAR		
	Hari 1	Hari 14	Hari 28
	1,46310	1,46720	1,48790
100,60	1,46540	1,47830	1,47820
	1,47410	1,46820	1,48490
Rata-rata	1,46750	1,47120	1,48360
SD	0,0058	0,0061	0,0049
% KV	0,3952	0,4174	0,3384

4.7. Orientasi SPE

SPE merupakan teknik pemurnian sampel sebelum dikromatografi. SPE digunakan untuk mengisolasi atau menarik analit dari matrik. Pada penelitian ini, orientasi SPE menggunakan dua jenis SPE yaitu SPE Aminopropil dan SPE C-18 dimana kedua SPE ini dibandingkan untuk mengetahui SPE mana yang memberikan hasil yang lebih optimal dan efisien.

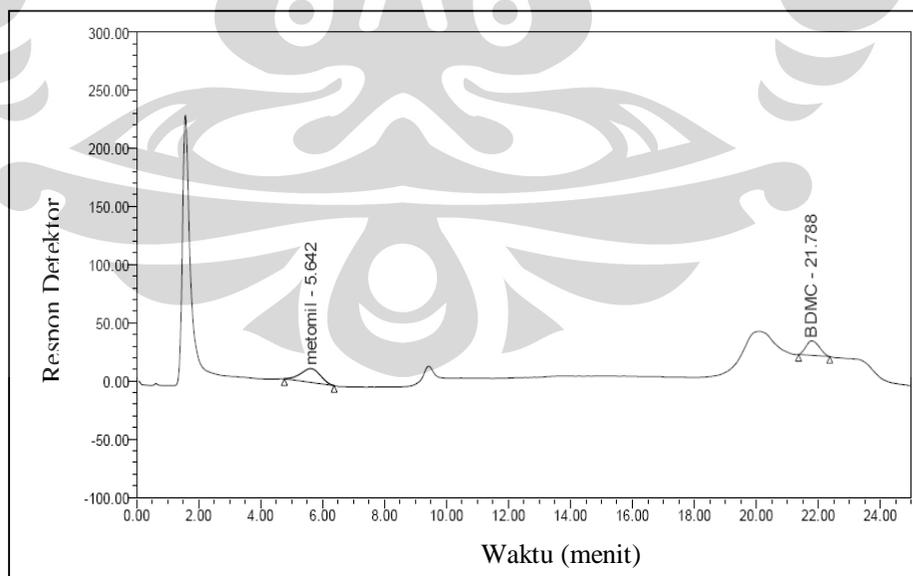
Tahap analisis pada orientasi sampel meliputi ekstraksi sampel dan pemurnian melalui SPE. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel timun organik yang telah memiliki sertifikat bebas bahan kimia dan bebas pestisida. Sampel timun hanya bagian kulit dan daging buahnya saja yang digunakan. Hal ini karena residu pestisida banyak terdapat pada bagian luar sayur-sayuran dan buah-buahan. Kemudian sampel buah timun sejumlah 25,0051 g dan 25,0730 g dihaluskan dengan cara diblender sampel timun bersama dengan asetonitril kemudian ekstrak disaring dengan corong yang dilapisi kertas saring. Filtrat yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 12. Kemudian filtrat dimasukkan di dalam corong ditambahkan NaCl lalu dikocok kuat beberapa menit dan diamkan hingga terbentuk 2 lapisan seperti pada Lampiran 13. Tahap selanjutnya yaitu pemurnian ekstrak dengan cara melewati ekstrak yang telah direkonstitusi ke dalam SPE Aminopropil dan SPE C-18. Pada tahap ini, sisa-sisa bahan pengganggu seperti pigmen, lemak dan sebagainya dapat ditahan di dalam SPE. Untuk mendapatkan kromatogram yang lebih baik, pada tahap pemurnian ekstrak dilakukan pembuangan eluat pertama yang melewati SPE setelah ekstrak dimasukkan ke dalam SPE. Kemudian segera ditampung larutan elusi metanol-diklorometan=(1:99) yang melewati SPE. Elusi dilakukan masing-masing sebanyak dua belas kali volum kolom. Hal ini dikarenakan sifat metomil yang cukup lama tertahan di SPE, tetapi meskipun telah dilakukannya elusi sebanyak 12 kali respon kromatogram juga tetap berkurang. Hal ini diduga karena proses pemurnian menggunakan SPE dilakukan secara manual hanya berdasarkan gaya gravitasi dan tidak dilengkapi dengan *vacum manifold* sehingga analit tidak tertarik sempurna. Skema proses pemurnian SPE dapat dilihat pada lampiran 1 dan 2.

Pada orientasi SPE diperoleh bahwa SPE yang lebih baik digunakan adalah SPE Aminopropil dimana puncak dari kromatogram yang dihasil SPE C-18 lebih

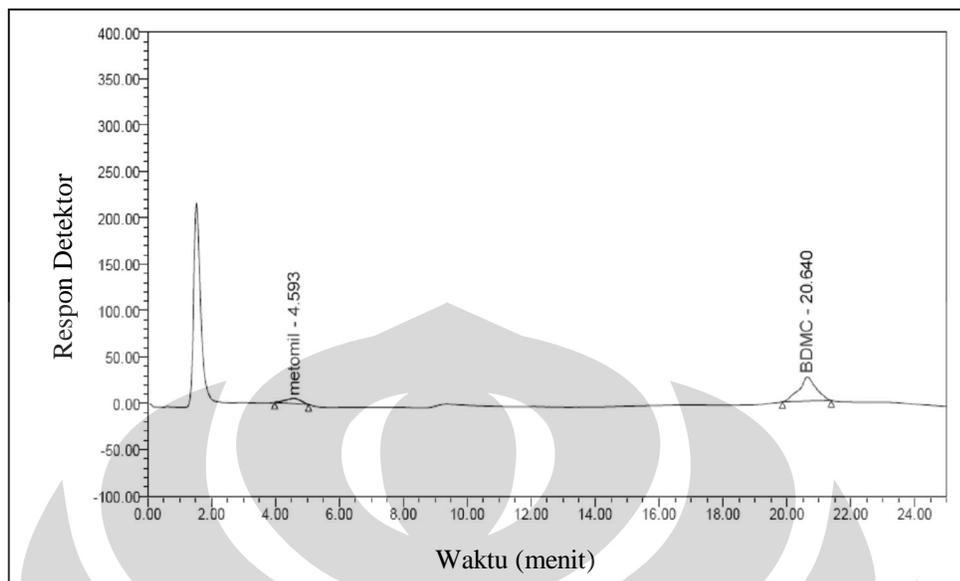
kecil dan melebar dibandingkan SPE Aminopropil. Selain itu berdasarkan hasil pengukuran orientasi SPE C-18 didapatkan perolehan kembali yang sangat kecil yaitu 20,26% sedangkan hasil perolehan kembali hasil orientasi SPE aminopropil sebesar 98,23%. Hal ini menunjukkan bahwa SPE yang lebih baik digunakan untuk pemurnian sampel adalah SPE Aminopropil karena memenuhi parameter berdasarkan perolehan kembali yang memenuhi persyaratan yaitu berada dalam rentang $100\pm 2\%$. Data dan kromatogram orientasi SPE selengkapnya adalah sebagai berikut

Tabel 4.10. Hasil pengukuran orientasi SPE

SPE	Konsentrasi (ng/mL) [X]	PAR [y]	PAR Rata-rata [\bar{y}]	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	UPK (%)	UPK Rata-rata (%)
Aminopropil	100,60	1,4206	1,4200	98,9230	98,8836	98,33	98,23
		1,4232		99,1048		99,51	
		1,4163		98,6223		98,03	
C-18	100,60	0,3004	0,2981	20,4646	20,3879	20,34	20,26
		0,3002		20,5734		20,45	
		0,2938		20,1258		20,00	



Gambar 4.7. Kromatogram campuran metomil konsentrasi 100,60ng/ml dan BDMC 109,0 ng/ml hasil uji SPE Aminopropil



Gambar 4.8. Kromatogram campuran standar metomid konsentrasi 100,6 ng/ml dan BDMC konsentrasi 109,0 ng/ml hasil uji SPE C-18

4.8. Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi) dari Sampel

Setelah diketahui SPE yang memberikan hasil yang lebih baik selanjutnya dilakukan uji akurasi dan presisi pada sampel dengan metode simulasi. Pada uji akurasi dan presisi konsentrasi yang digunakan adalah 40,24; 60,36; dan 100,60 ng/mL. Konsentrasi terendah pada uji ini tidak dilakukan pada konsentrasi 20,12, karena pada konsentrasi tersebut hasil ekstraksi sampel simulasi tidak dapat terdeteksi sehingga konsentrasi ditingkatkan hingga 40,24 ng/mL. Uji akurasi dan presisi dilakukan penyuntikan sebanyak enam kali pada setiap konsentrasi.

Uji akurasi dilakukan untuk melihat derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sesungguhnya. Parameter uji akurasi yang baik bila perolehan kembali berada dalam rentang $100 \pm 2\%$. Berdasarkan hasil rata-rata uji perolehan kembali dengan konsentrasi sebesar 40,24; 60,36 dan 100,60 ng/mL berturut-turut antara lain dan 98,17; 100,27; dan 98,39%. Berdasarkan rata-rata hasil perolehan kembali baik konsentrasi 40,24; 60,36 dan 100,6 ng/mL memberikan perolehan kembali yang berada dalam rentang 98-102%, sehingga didapatkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sesungguhnya.

Hasil rata-rata koefisien variasi dari ketiga konsentrasi yaitu konsentrasi 40,24; 60,36 dan 100,6 berturut-turut adalah 0,60; 0,85 dan 0,35%. Berdasarkan koefisien

variasi yang didapatkan menggambarkan kriteria seksama karena semua koefisien variasi dari ketiga konsentrasi berada dibawah 2%.

Pada uji akurasi dan presisi dari sampel simulasi, standar metomil dan baku dalam BDMC sama-sama ditambahkan di dalam ekstrak sampel lalu melewati tahap pemurnian melalui SPE Aminopropil sehingga analit standar metomil dan baku dalam BDMC sama-sama tertahan di dalam SPE sehingga secara perhitungan juga didapat korelasi yang linear perbandingan luas puncak (PAR) yang dihasilkan standar metomil dan baku dalam BDMC. Maka dari itu semua data uji akurasi yang diperoleh memberikan nilai perolehan kembali yang berada dalam rentang 100 ± 2 %. Begitu juga semua data presisi baik konsentrasi 40,24 ; 60,36 dan 100,60 ng/mL memberikan nilai koefisien variasi dibawah 2%.

Tabel 4.11. Hasil pengukuran kecermatan (akurasi) dalam sampel

Konsentrasi (ng/mL) [x]	PAR [y]	PAR Rata-rata [\bar{y}]	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	% diff	UPK (%)	UPK Rata-rata (%)
40,24	0,5705	0,5690	39,4755	39,4392	-1,899	98,10	98,17
	0,5676		39,2727		-2,404	97,59	
	0,5681		39,3076		-2,317	97,68	
	0,5758		39,8461		-0,979	99,02	
	0,5691		39,3776		-2,143	97,85	
	0,5746		39,7691		-1,170	98,83	
60,36	0,8769	0,8715	60,9021	60,5279	0,898	100,89	100,27
	0,8778		60,9650		1,002	101,00	
	0,8613		59,8111		-0,909	99,09	
	0,8763		60,8601		0,829	100,82	
	0,8741		60,7062		0,573	100,57	
	0,8629		59,9230		-0,724	99,27	
100,60	1,4206	1,4172	98,9230	98,9854	-1,077	98,33	98,39
	1,4163		98,6223		-1,378	98,03	
	1,4204		99,5034		-0,496	98,91	
	1,4111		98,8495		-1,150	97,26	
	1,4119		98,9099		-1,090	98,32	
	1,4232		99,1048		-0,895	98,51	

Tabel 4.12. Hasil pengukuran keseksamaan (presisi) metomid dalam sampel

Konsentrasi (ng/ml) [x]	PAR [y]	PAR Rata-rata [\bar{y}]	SD	KV (%)
40,24	0,5705	0,5692	0,0034	0,5973
	0,5676			
	0,5681			
	0,5758			
	0,5691			
	0,5746			
60,36	0,8769	0,8715	0,0074	0,8491
	0,8778			
	0,8613			
	0,8763			
	0,8741			
	0,8629			
106,00	1,4206	1,4172	0,0049	0,3512
	1,4163			
	1,4204			
	1,4111			
	1,4119			
	1,4232			

4.9. Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi

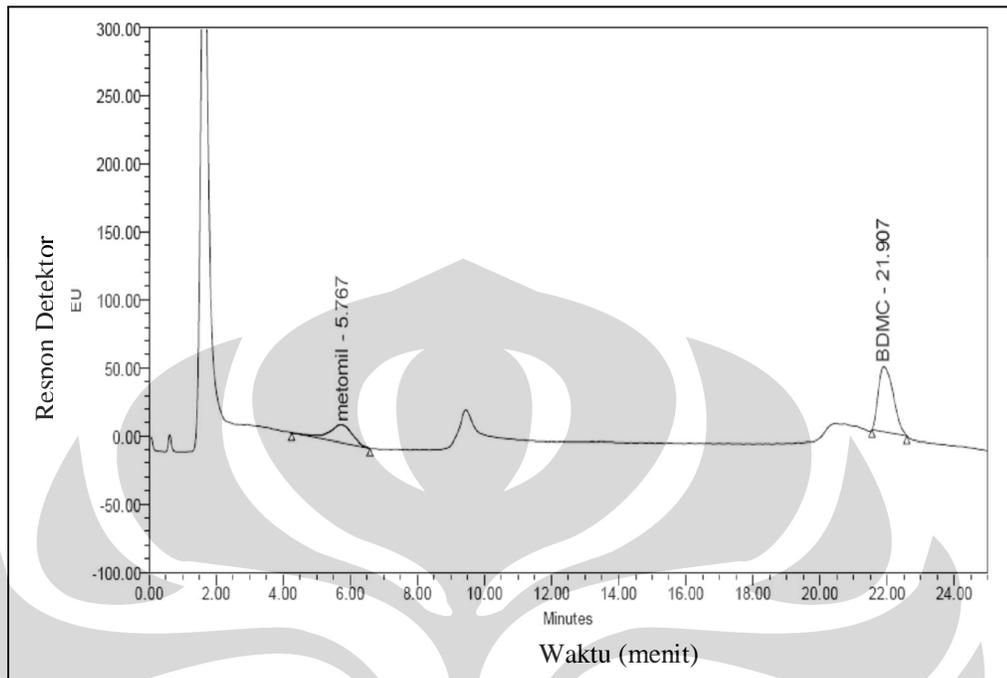
Pengujian ini dilakukan untuk melihat efisiensi proses ekstraksi pada sampel dengan metode simulasi dimana standar metomil konsentrasi 100,6 ng/mL ditambahkan pada filtrat sampel dan baku dalam BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL yang ditambahkan pada rekonstitusi akhir sebelum disuntikkan ke dalam alat KCKT.

Dari hasil penyuntikan sebanyak empat kali dapat dilihat bahwa deviasi terjadi karena adanya proses ekstraksi cukup besar dimana standar metomil melewati proses ekstraksi, penguapan dan pemurnian melalui SPE. Sedangkan baku dalam (BDMC) tidak melewati proses-proses tersebut. Hal ini berbeda pada uji akurasi presisi sampel ketika standar metomil dan baku dalam BDMC sama-sama melalui proses ekstraksi, penguapan dan penahan analit selama pemurnian melalui SPE. Dari hasil pengujian diketahui rata-rata persentase perolehan kembali hanya sebesar 28,86%. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi selisih persentase perolehan kembali sebesar 71,14 %.

Uji kuantitatif dari sampel lebih baik menggunakan baku dalam sebagai faktor koreksi dari proses ekstraksi yang dilakukan sehingga dapat diketahui efisiensi dari metode ekstraksi yang dilakukan. Data dan kromatogram selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.13. Hasil Uji perolehan kembali pada sampel B

Konsentrasi (ng/mL) [x]	PAR [y]	PAR Rata-rata [\hat{y}]	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	UPK (%)	UPK Rata- rata (%)
	0,3996		27,5244		27,36	
100,60	0,4388	0,4206	30,2657	29,0053	30,08	28,86
	0,4232		29,0258		29,17	
	0,4209		29,0139		28,84	



Gambar. 4.9. Kromatogram campuran standar metomid konsentrasi 100,6 ng/mL yang diekstraksi dari sampel simulasi dan internal standar BDMC konsentrasi 109,0 ng/mL yang ditambahkan pada rekonstitusi terakhir

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Analisis residu pestisida metomil dapat dilakukan dengan KCKT menggunakan kolom fase terbalik dimetiloktadesilsilil (Waters Carbamate Column, 3,9 x 150 mm) dengan elusi fase gerak secara gradien; kecepatan alir 1,5 mL/menit; suhu kolom 30°C; suhu reaktor pasca kolom 80°C; kecepatan alir reagen pasca kolom masing-masing 0,5 mL/menit; dan menggunakan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm.
2. Cara pemurnian ekstraksi residu pestisida metomil dalam buah timun dengan SPE Aminopropil tidak memberikan hasil yang optimal karena persentase perolehan kembali dari cara pemurnian ekstraksi yang digunakan adalah sebesar 28,86 %.

5.2. Saran

1. Perlu dilengkapi alat ekstraksi dengan menggunakan SPE Aminopropil karena kromatogram hasil ekstraksi memberikan hasil yang kurang optimal.
2. Perlu dikembangkan analisis pestisida metomil pada sampel buah-buahan atau sayur-sayuran yang lainnya.

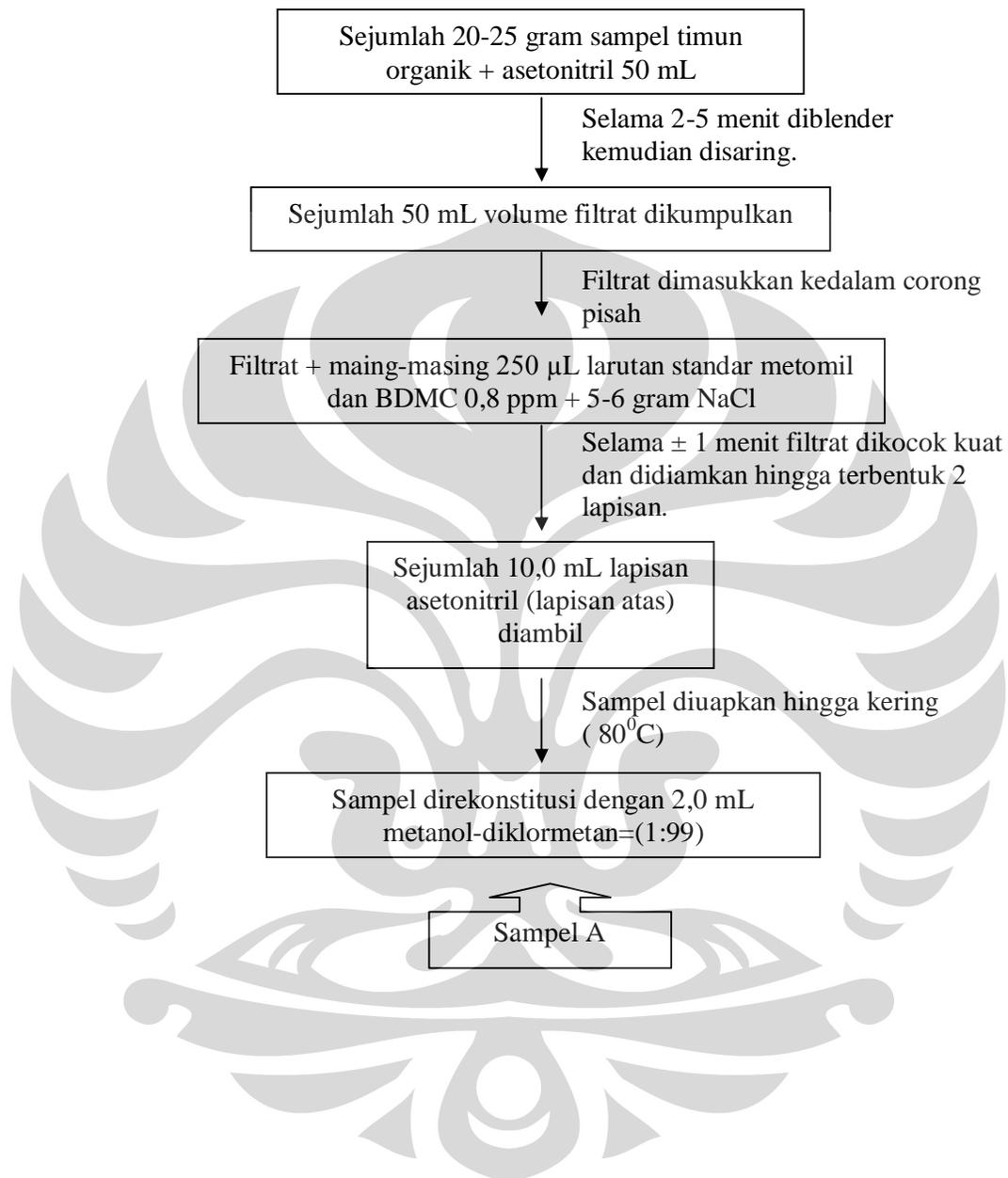
DAFTAR ACUAN

- Connell, D. W., dan Miller, G.J. (1995). *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran*. Terj, oleh Y. Koestoer. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Djojosumartio, Panut. (2008). *Pestisida dan Aplikasi*. Jakarta : PT Agromedia Pustaka.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi Depok :FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita. (2006). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas.
- IPCS. (1996). *Enviromental Health Criteria 178 Methomyl*. Ganeva : WHO.
- Johnson, EL. dan Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Terj. dari *Basic Liquid Chromatography*, oleh K. Padmawinata. Bandung : ITB.
- Komisi Pestisida. (1997). *Metode Pengujian Residu Pestisida Dalam Pertanian*. Departemen Pertanian.
- Kusnindar. (1989). *Keracunan Pestisida pada Petani di Berbagai Daerah di Indonesia*. Departemen Kesehatan RI, Jakarta: 3 hlm. http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/55_08_KeracunanPestisidapadaPetani.pdf/55_08_KeracunanPestisidapadaPetani.html, 8 januari 2010, pkl 20.17.
- Munson, JW. (1991). *Analisis Farmasi Metode Modern*. Terj. dari *Pharmaceutical Analisis Modern Methods*, oleh Harjana. Surabaya : Airlangga University Press.
- Nollet, LML. (1992). *Food Analysis By HPLC*. New York : Marcel Dekker.
- Pickering Laboratories. (2006). *Post-Column LC Analysis of 23 N-Methylcarbamate*. USA.
- Pickering Laboratories. (2006). *Post-Column LC Analysis Colomns*. USA.
- Priyanto. (2009). *Toksikologi Mekanisme, Terapi Antidotum, dan Penilaian Resiko*. Depok: LESKONFI.

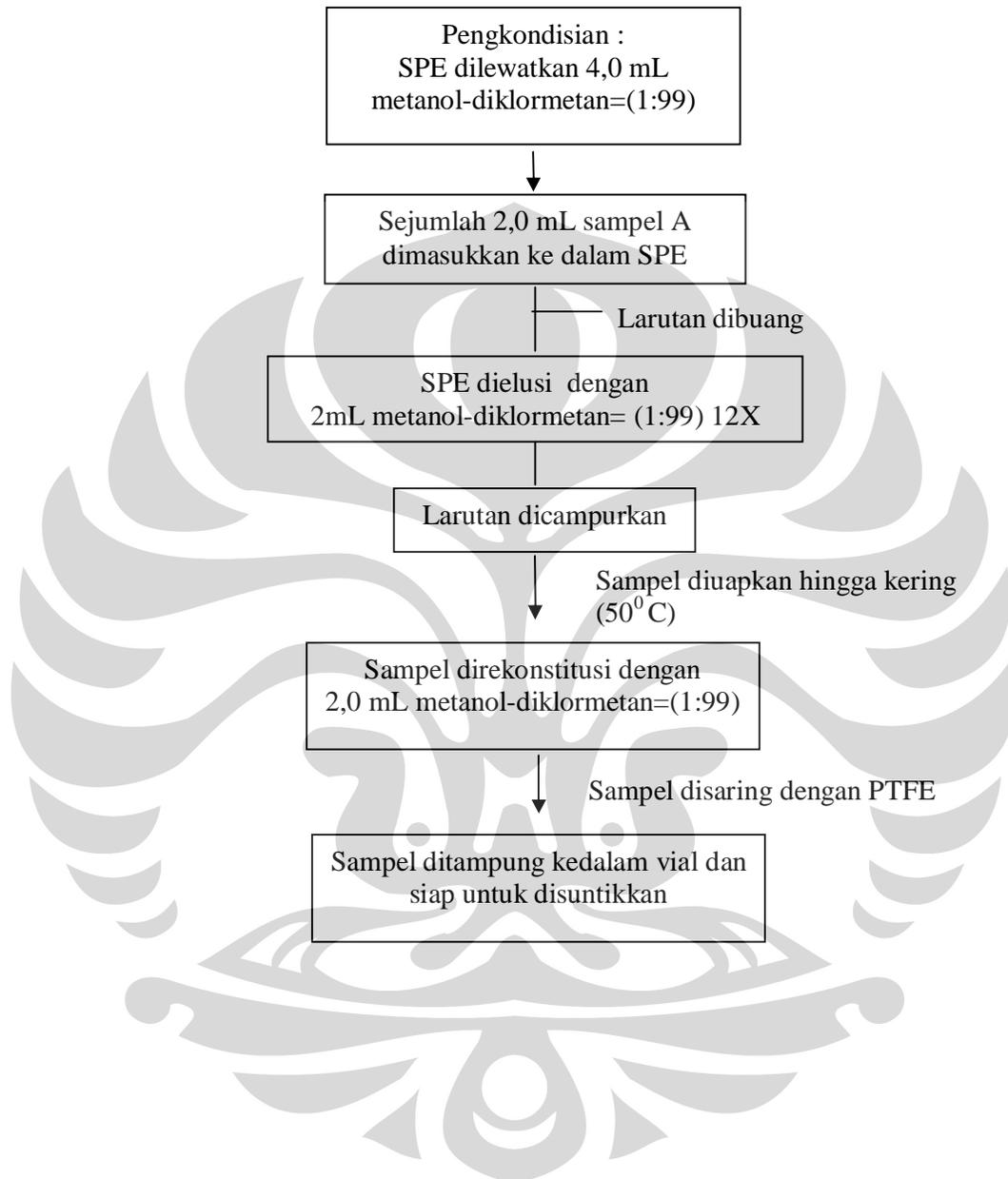
- Satiadarma, Kosasih. Mulja, Muhammad. Tjahjono, Daryono Hadi. Kartasasmita, Rahmana Emran (2004) *Asas Pengembangan Prosedur Analisis* Edisi I: 46-51. Surabaya: Airlangga University Press.
- Schmidt, Henner. (2005). *Preparative Chromatography*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Skoog, D.A. dan Leary, J.J. (1992). *Principles of Instrumental Analysis*, 4th edition. Saunders College Publishing, Florida: 628-641.
- Sudarmo, Subiyakto. (1990). *Pestisida Tanaman*. Yogyakarta : Kanisius.
- Sudjadi. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar.
- Sulistiyo, Luluk. *Dilema Penggunaan Pestisida Dalam Pertanian Tanaman Hortikultura di Indonesia*. IPB, Bogor : http://rudycr.com/PPS702-ipb/08234/luluk_sulistiyo.pdf, 8 januari 2010 pkl 20.00.
- Suzanne, N. (1998). *Food Analysis Second Edition*. Aspen Publisher. USA
- Tarumingkeng, Rudi. (1992). *Insektisida Sifat, Mekanisme Kerja dan Dampak Penggunaannya*. Jakarta : UKRIDA.
- Waters Corporation. (1996). *Waters Carbamate Analysis System*. USA: Waters Corporation
- Waters Corporation. (1999). *Water post-column Reaction Module*. USA: Waters Corporation
- Waters Corporation. (2003). *Water Alliance System for Carbamate Analysis*. USA: Waters Corporation
- Waters Corporation. (2006). *Environmental Chromatography Methods Guide*. USA: Waters Corporation
- Waters Corporation. (2008). *Food Safety Application Notebook*. USA: Waters Corporation
- Wudianto, Rini (2006). *Petunjuk Penggunaan Pestisida*. Jakarta : Penebar Swadaya



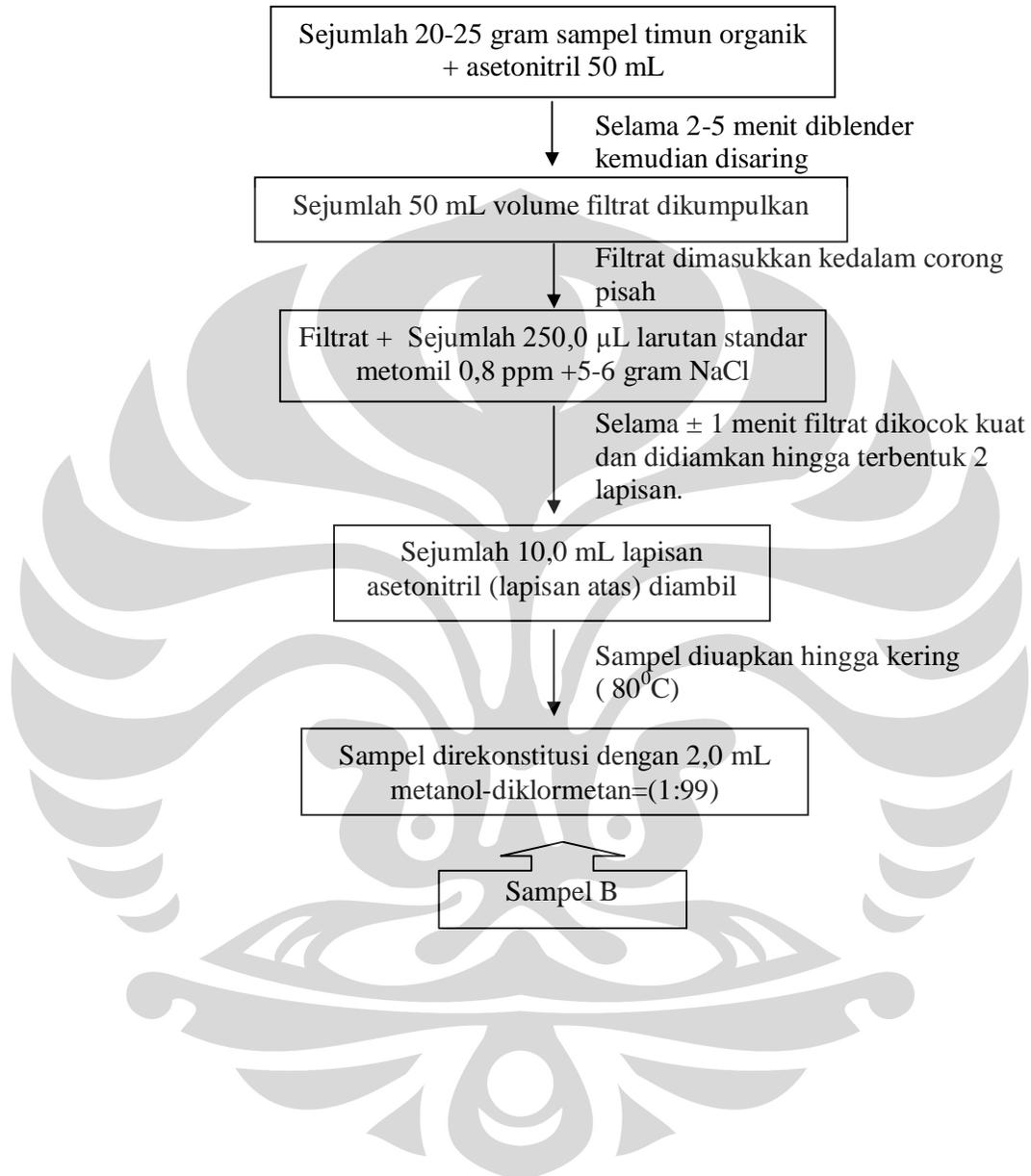
Lampiran 1. Skema ekstaksi sampel simulasi



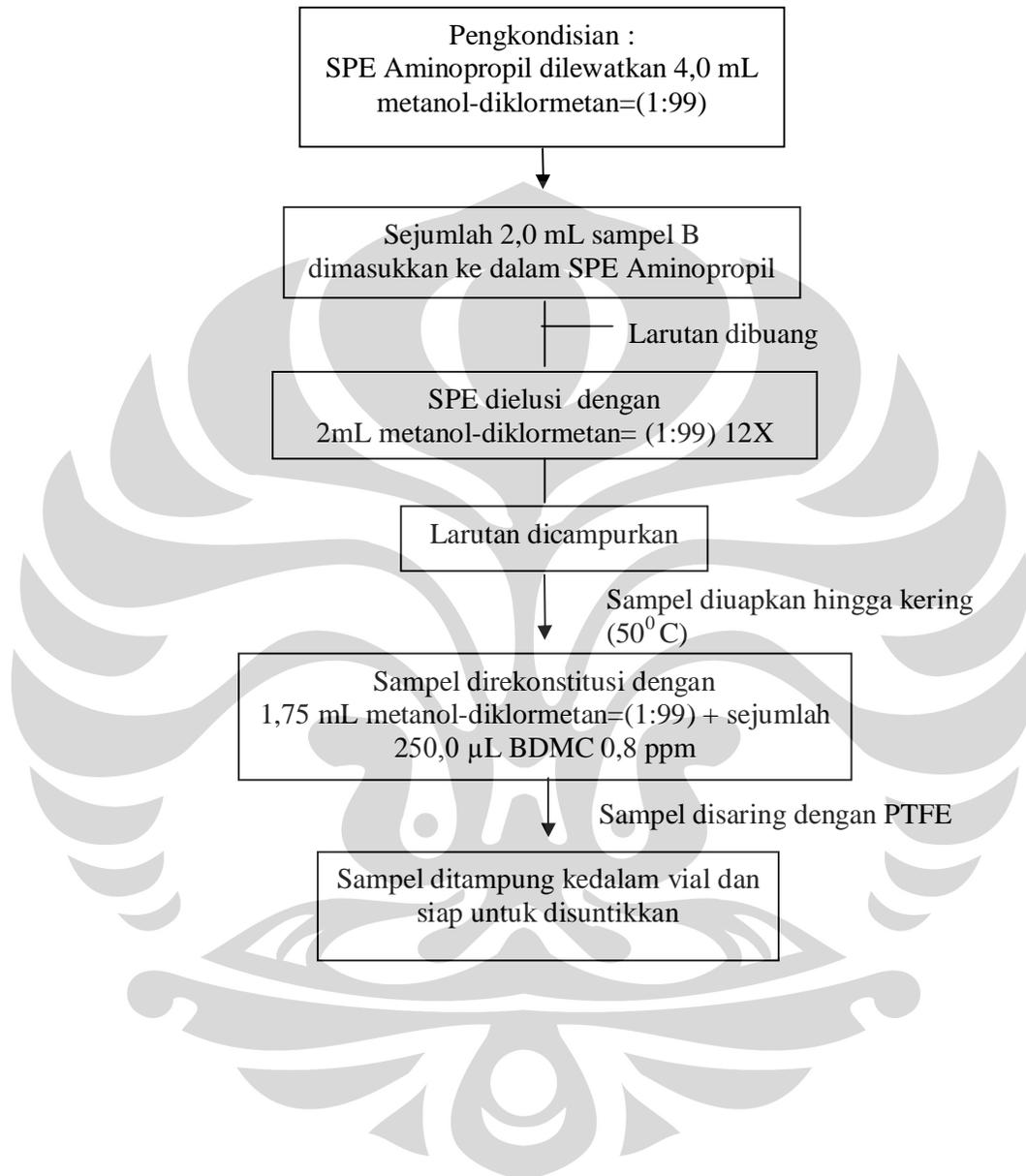
Lampiran 2. Skema pemurnian dengan SPE



Lampiran 3. Skema ekstraksi untuk uji perolehan kembali dari sampel simulasi



Lampiran 4. Skema pemurnian dengan SPE untuk uji perolehan kembali dari sampel simulasi



Lampiran 5. Cara perhitungan efisiensi kolom

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$HETP = \frac{L}{N}$$

Dimana :

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = Panjang lempeng teoritik

t_R = Waktu retensi

W = Lebar puncak

L = Panjang kolom

Lampiran 6. Cara perhitungan resolusi

$$R = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{W_A + W_B}$$

Dimana :

R = Resolusi

t_{RB} = Waktu retensi spesi B

t_{RA} = Waktu retensi spesi A

W_B = Lebar puncak spesi B

W_A = Lebar puncak spesi A

Lampiran 7. Cara perhitungan faktor ikutan (T_f)

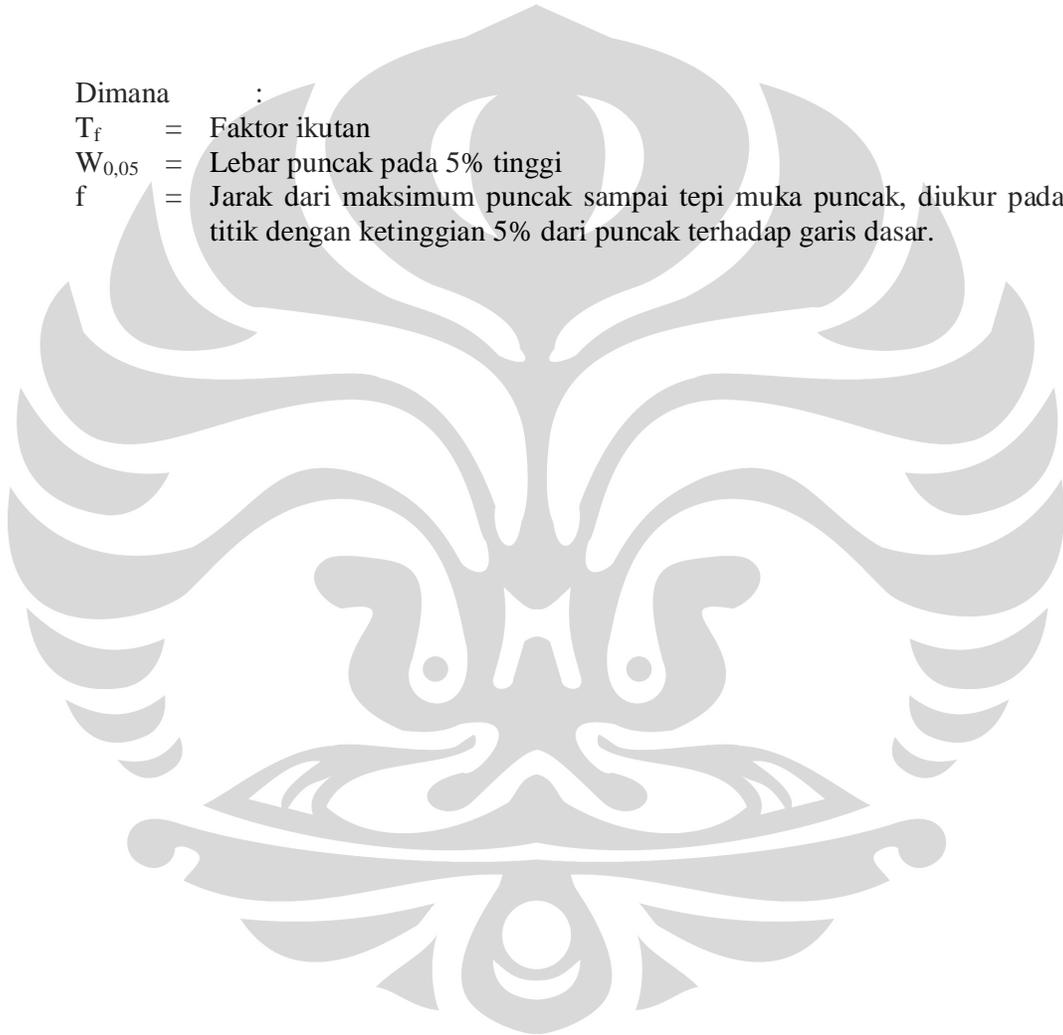
$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Dimana :

T_f = Faktor ikutan

$W_{0,05}$ = Lebar puncak pada 5% tinggi

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, diukur pada titik dengan ketinggian 5% dari puncak terhadap garis dasar.



Lampiran 8. Perhitungan kurva kalibrasi

Dari kurva kalibrasi didapatkan persamaan garis : $y = a + bx$;

r = koefisien korelasi

a dan b dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{n \times \sum x_i \cdot y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{(\sum x_i^2) (\sum y_i) - (\sum x_i) (\sum x_i \cdot y_i)}{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

korelasi (r) dihitung dengan rumus :

$$r = \frac{n \times \sum x_i \cdot y_i - (\sum x_i) \cdot (\sum y_i)}{\sqrt{\{n \times \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2\} \times \{n \times \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2\}}}$$

Lampiran 9. Perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

Rumus :

$$a. \text{ Batas Deteksi (LOD)} = \frac{3 (S_{y/x})}{b}$$

$$b. \text{ Batas Kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 (S_{y/x})}{b}$$

$$S_{y/x} = \left[\frac{\sum (y - y')^2}{n-2} \right]^{1/2}$$

Keterangan :

b = Arah garis linear dari kurva kalibrasi ; $y = a+bx$

$S_{y/x}$ = Simpangan baku residual

y = Luas puncak terukur

y' = Luas puncak berdasarkan persamaan kurva kalibrasi

Lampiran 10. Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

Perhitungan uji keterulangan dilakukan dengan mencari simpangan baku atau standar deviasi (SD) dan koefisien variasi.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Keterangan :

x = Berat/ μ L (μ g)

\bar{x} = Berat/ μ L rata-rata (μ g)

n = Jumlah data

Lampiran 11. Cara perhitungan perolehan kembali (akurasi)

$$\% \text{ diff} = \frac{(\hat{x} - x)}{x} \times 100\%$$

$$UPK = \frac{\hat{x}}{x} \times 100\%$$

Keterangan :

\hat{x} = Konsentrasi terukur

x = Konsentrasi Sebenarnya

Lampiran 12. Penyaringan sampel buah timun



Keterangan : A = Filtrat sampel buah timun

Lampiran 13. Hasil ekstraksi sampel buah timun setelah penambahan garam NaCl



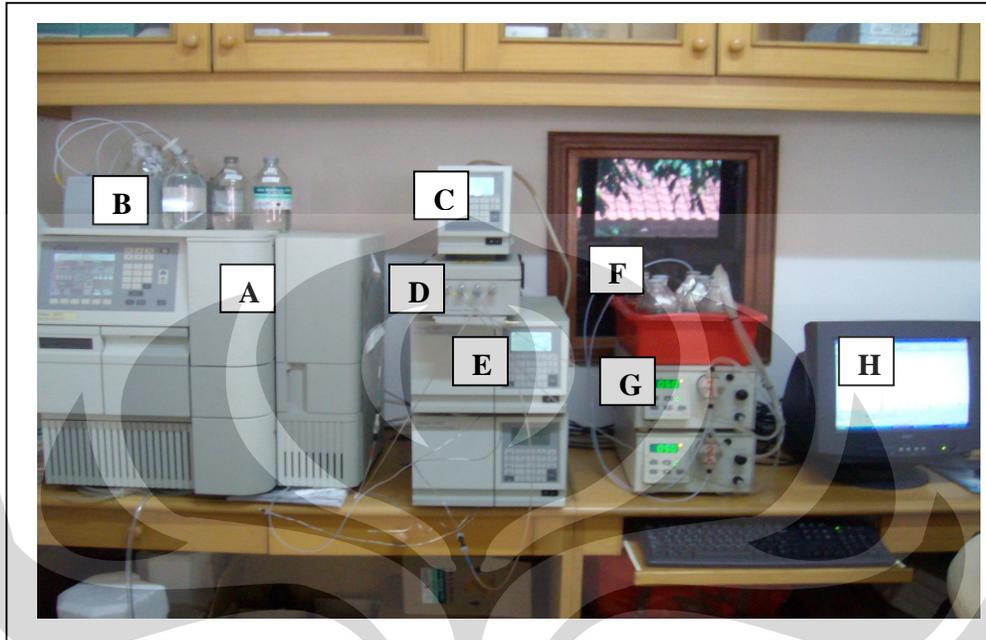
Lampiran 14. Pemurnian sampel dengan SPE Aminopropil



Lampiran15. Sampel buah timun organik



Lampiran 16. Instrumen KCKT



Keterangan :

- A. Pemisah Kromatogram (Waters 2695 Separation Module)
- B. Reservoir Fase Gerak
- C. Pengatur Suhu Pasca Kolom (Waters *Temperature Control Module*)
- D. Reaktor Pasca Kolom (Waters *Post-Column Reaction Module*)
- E. Detektor Fluoresensi (Waters 2475)
- F. Reagen Pasca Kolom
- G. Pompa Reagen Pasca Kolom (Waters *Reagen Manager*)
- H. Sistem Kontroler (Empower Software)

Lampiran 17. Sertifikat analisis metomil

125 Market Street New Haven, CT 06513 US		 AccuStandard, Inc.		Tel (203) 786-5280 Fax (203) 786-5287 Web www.accustandard.com	
CERTIFICATE OF ANALYSIS					
CATALOG NO: P-032S		DATE CERTIFIED: Oct 5, 2009			
DESCRIPTION: Methomyl		EXPIRATION: Oct 5, 2011			
LOT: B8040031-1A		SAMPLE SIZE: 1 mL			
SOLVENT: Methanol		STORAGE CONDITION: Freeze (<-10° C)			
		HAZARDS: FLAMMABLE			

Component	CAS No.	Purity % (HPLC)	Prepared Concentration ¹ (µg/mL)	Certified Analyte Concentration ² (µg/mL)
Methomyl	16752-77-5	99.9	100.7	100.6

Please note:
A product with a suffix (-1A, -2B, etc. or -01, -02, etc.) on its lot number has had its expiration date extended and is identical to the same lot number without the suffix.

AccuStandard follows U.S. conventions in reporting numerical values on both certificates and labels:
A comma (,) is used to separate units of one-thousand or greater.
A period (.) is used as a decimal place marker.

1. All weights are traceable through NIST, Test No.822/272103-05
2. Certified Analyte Concentration = Purity x Prepared Concentration. The Uncertainty calculated for this product is ±2% which is the Combined Uncertainty (ucty). It represents an estimated standard deviation equal to the positive square root of the total variance of the uncertainty of components. The Expanded Uncertainty is U which is Ucty) *K where K is the coverage factor at the 95% confidence level (K=2).

Certified by: 
Russ Cooper, QC Manager

For use in routine laboratory analysis.
AccuStandard is accredited to ISO/IEC 17025:2005

OR-010-031
Rev. 09/02

Alteration of any information contained herein without written permission from AccuStandard strictly prohibited.

Lampiran 18. Sertifikat analisis BDMC

ChemService

660 Tower Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599
1-800-452-9994 • 1-610-692-3026 • Fax 1-610-692-8729
info@chemservice.com • www.chemservice.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

INVOICE #: CS294832
PO #: POR14874

CATALOG #: PS-450
DESCRIPTION: BDMC

LOT #: 395-91B
PURITY: 99%

EXPIRATION DATE: 01/12

Chem Service, Inc. guarantees the purity of this chemical $\pm 0.5\%$ deviation prior to the expiration date shown on the label and exclusive of any customer contamination.

Two or more of the following methods of analysis are used to determine purity: Melting point, refractive index, titration, FTIR, IR, TLC, GC/FID, GC/TCD, GC/ECD, GC/MS, HPLC or DSC.

Our standards are suitable for use with all EPA methods.

Certified By:


John Conrad
CSM/TC

  
ISO 9001
Certificate Number: 31610

Lampiran 19. Sertifikat analisis SPE Aminopropil



 THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™

Certificate of Analysis

Single Use Only

Sep-Pak® **Sep-Pak® Vac 6cc (500mg)** **Waters**
NH₂ Cartridges

Qty/Box: 30
 Part No.: WAT054560 Lot No.: 006339337A

Waters Made in Ireland

Product Test Results

	Result		Result
Average Sorbent Weight	Pass	Average Air Flow Rate	Pass

Production Approved: Billy Mooney Date: 10-DEC-09
 Manufacturing

Sep-Pak® Amino Propyl (NH₂) Sorbent Batch # 063

Sorbent Test Results

	Result
Surface Area (m ² /g)	294
Carbon (%)	4.2
Moisture (%)	0.7
Particle Size – 10% Volume (µm)	57.2
Particle Size – 90% Volume (µm)	91.3

Sorbent Selectivity Test – Chromatography

Relative Retention	Result
Salicylic Acid / Gentisic Acid	Pass
Acetylsalicylic Acid / Salicylic Acid	Pass

Material Approved: Joan P. Robinson Date: 09 June 2009
 Quality Control

Sep-Pak and Waters are trademarks of Waters Corporation.
 © Waters Corporation 2003.

WAT049117 Rev. 2

Form # 1620 - Rev. 1

Waters and The Science of What's Possible are trademarks of Waters Corporation. © 2008 Waters Corporation
 Waters Corporation 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com

Lampiran 20. Sertifikat analisis SPE C-18

Certificate of Analysis

**Sep-Pak® Classic
C18 Cartridges**

Single Use Only Qty/Box: 50

Part No.: WAT051910 Lot No.: 028837341A

Product Test Results

Average Sorbent Weight	Result Pass	Average Air Flow Rate	Result Pass

Production Approved: *Serena Simatt* Date: 14th Dec '07
 Manufacturing

Sep-Pak® C18 Sorbent Batch # 288

Sorbent Test Results

Parameter	Result
Surface Area (m ² /g)	309
Carbon (%)	11.8
Moisture (%)	0.5
Particle Size – 10% Volume (µm)	55.1
Particle Size – 90% Volume (µm)	90.0

Sorbent Selectivity Test – Chromatography

Relative Retention	Result
Propylparaben / Acenaphthene	Pass
Toluene / Acenaphthene	Pass
Propranolol / Acenaphthene	Pass
Dibutyl Phthalate / Acenaphthene	Pass
Doxepin / Acenaphthene	Pass

Material Approved: *John P. Boehman* Date: 06 August 2007
 Quality Control

Sep-Pak and Waters are trademarks of Waters Corporation.
 © Waters Corporation 2003.

Form # 1625 - Rev. 1

Waters Corporation, 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com