



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU PESTISIDA  
KARBARIL MENGGUNAKAN BUAH TOMAT MERAH  
ORGANIK SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI PASCA KOLOM**

**SKRIPSI**

**HERNI ASIH SETYORINI  
0706197401**

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



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**VALIDASI METODE ANALISIS RESIDU PESTISIDA  
KARBARIL MENGGUNAKAN BUAH TOMAT MERAH  
ORGANIK SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI PASCA KOLOM**

**SKRIPSI**

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

**HERNI ASIH SETYORINI  
0706197401**

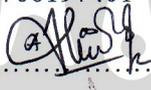
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Herni Asih Setyorini

NPM : 0706197401

Tanda Tangan :  .....

Tanggal : 09 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

**Skrripsi** ini diajukan oleh :  
**Nama** : Herni Asih Setyorini  
**NIM** : 0706197401  
**Program Studi** : Ekstensi Farmasi  
**Judul Skripsi** : Validasi Metode Analisis Residu Pestisida Karbaril Menggunakan Buah Tomat Merah 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** : Dr. Silvia Surini, M.Pharm.Sc (.....)  
**Penguji III** : Dra. Juheini Amin, MS (.....)

**Ditandatangani di** : Depok  
**Tanggal** : 9-7-2010....

## KATA PENGANTAR

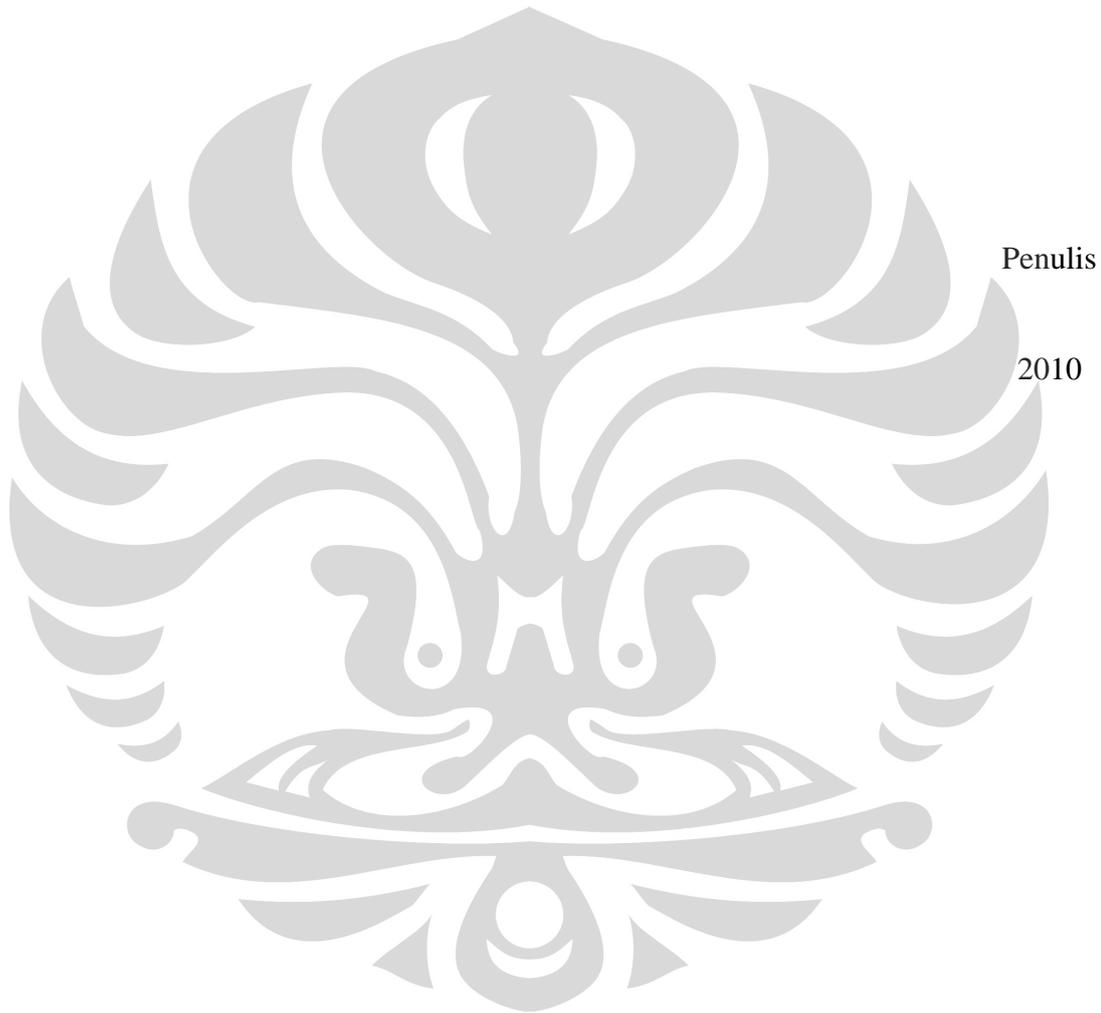
Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat, nikmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Universitas Indonesia.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan rasa terima kasih yang tak terhingga kepada pihak-pihak yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan dan semangat kepada penulis selama menjalankan penelitian dan penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Dr. Arry Yanuar, M.Si., selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing, memberikan dukungan, dan bantuan selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Drs. Bambang Wispriyono Apt., Ph.D, selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan pikirannya dalam membimbing, memberikan dukungan dan bantuan selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Dra. Juheini Amin, MS, selaku pembimbing akademik atas dukungan dan arahan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
5. Laila Fitria, SKM., MKM, selaku penanggung jawab Laboratorium Kesehatan Lingkungan FKM, Bapak Haryo dan semua staf Laboratorium Kesehatan Lingkungan FKM yang telah memberikan pengarahan kepada penulis selama penelitian.
6. Bapak Iskandar, Bapak Kusuma, Bapak Ajis dan Bapak Zaqy dari Waters atas bantuan dan saran-saran yang telah diberikan.
7. Ibu dan Bapakku tersayang yang telah mencurahkan kasih sayang, doa, perhatian dan kesabarannya dalam mendampingiku selama ini. Kakakku Dayu yang telah memberikan perhatian, kasih sayang dan bantuannya.
8. Sahabat-sahabatku (Titiek, Nana, Vivid, Merylin, Erin, Phieka, Ashfar) dan teman-teman S1 Ekstensi Farmasi 2007 yang telah memberikan bantuan, semangat dan keceriaan.

9. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sebagai untuk menyempurnakan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat khususnya dalam bidang ilmu pengetahuan.



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

---

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

Nama : Herni Asih Setyorini  
NPM : 0706197401  
Program Studi : Ekstensi Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demikian 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 Karbaril Menggunakan Buah Tomat Merah 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 memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 09 Juli 2010

Yang menyatakan



(Herni Asih Setyorini)

## ABSTRAK

Nama : Herni Asih Setyorini  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Validasi Metode Analisis Residu Pestisida Karbaril Menggunakan Buah Tomat Merah Organik Secara Kromatografi Cair kinerja Tinggi Pasca Kolom

Karbaril merupakan salah satu golongan pestisida N-metilkarbamat yang pertama kali sukses dipasarkan, biasa digunakan sebagai insektisida. Karbaril bekerja dengan cara menghambat asetilkolinesterase, dimana asetilkolin yang dihasilkan akan terakumulasi didalam tubuh sehingga mengakibatkan menurunnya koordinasi otot-otot tubuh, konvulsi dan bahkan kematian. Karbaril dapat dianalisis dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pasca kolom melalui proses hidrolisis dengan NaOH menjadi metilamin dan derivatisasi dengan ortoftalaldehid (OPA) dan 2-merkaptotanol menjadi senyawa berfluoresensi, sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluoresensi. Kondisi analisis karbaril menggunakan KCKT pasca kolom adalah sebagai berikut: kolom fase balik dimetiloktadesilsilil (3,9 x 150 mm), fase gerak gradien (air-metanol-asetonitril) dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, suhu reaktor pasca kolom 80°C, kecepatan alir reagen pasca kolom 0,5 mL/menit, panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm. Metode yang digunakan berdasarkan metode EPA (Environmental Protection Agency) ini telah memenuhi persyaratan validasi yaitu parameter akurasi, presisi dan linearitas, dimana memiliki batas deteksi sebesar 2,26 ng/mL dan batas kuantitasi 7,53 ng/mL. Sampel yang digunakan untuk uji perolehan kembali adalah buah tomat merah organik. Sampel simulasi diekstraksi dengan asetonitril dan natrium klorida, kemudian dimurnikan dengan SPE aminopropil menggunakan metanol-diklormetan (1:99) sebanyak sepuluh kali 2 mL dan dihasilkan perolehan kembali sebesar 8,28%.

Kata kunci : derivatisasi, karbaril, KCKT pasca kolom, pestisida.

xiii + 66 halaman : 8 gambar, 10 tabel, 17 lampiran  
Bibliografi : 31 (1979-2009)

## ABSTRACT

Name : Herni Asih Setyorini  
Program Study : Pharmacy  
Title : Validation Analytical Methods of Carbaryl Pesticide Residues Using Organic Red Tomato by Post Column High Performance Liquid Chromatography

Carbaryl is one of the N-methyl carbamates pesticide groups that the first marketed successfully, used as an insecticide. Carbaryl works by inhibiting acetylcholinesterase, in which acetylcholine produced will accumulate in the body that can result in decreased body muscle coordination, convulsion and even death. Carbaryl can be analyzed by post column High Performance Liquid Chromatography (HPLC) through hydrolysis process with NaOH become methylamine and derivatization with orthophthalaldehyde (OPA) and 2-mercaptoetanol become a fluorescence compound that can be detected with fluorescence detector. Carbaryl analysis condition using post column HPLC were as: dimethyloctadecylsilyl reversed phase column (3,9 x 150 mm), gradient movement phase (methanol-acetonitrile-water) with flow rate 1,5 mL/min, column temperature 30°C, post column reactor temperature 80°C, post column reagent flow rate 0,5 mL/min, wavelength excitation 339 nm and emission 445 nm. The method used by EPA method (Environmental Protection Agency) is complete validation parameters of accuracy, precision and linearity, which has a detect limitation of 2,26 ng/mL and a quantity limitation of 7,53 ng/mL. The sample used for the recovery test were organic red tomato. The sample were extracted by simulation with acetonitrile and sodium chloride then purified by aminopropyl SPE using methanol-dichlormethane (1:99) as much as ten times 2 mL and generated acquisitions returns of 8,28%.

Keywords: derivatization, carbaryl, post column HPLC, pesticides.

xiii + 66 pages: 8 figures, 10 tables, 17 appendixes

Bibliography : 31 (1979-2009)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vi
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Pestisida .....	4
2.2 Insektisida Karbamat .....	5
2.3 Analisis Kuantitatif Residu Pestisida.....	8
2.4 Hidrolisis dan Derivatisasi .....	9
2.5 Reaktor Pasca Kolom.....	12
2.6 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
2.7 Metode Analisis Residu Pestisida N-metilkarbamat.....	16
2.8 SPE.....	17
2.9 Validasi Metode Analisis.....	18
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.2 Alat.....	21
3.3 Bahan.....	21
3.4 Cara Kerja.....	22
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Larutan Standar .....	28
4.2 Larutan Pereaksi.....	28
4.3 Kondisi Analisis.....	29
4.4 Uji Kesesuaian Sistem.....	31
4.5 Uji Linearitas.....	32
4.6 Uji Kecermatan (Akurasi) Karbaril.....	33
4.7 Uji Keseksamaan (Presisi) Karbaril.....	35
4.8 Uji Stabilitas.....	36
4.9 Orientasi SPE.....	36
4.10 Uji Kecermatan (Akurasi) dalam Sampel.....	39
4.11 Uji Keseksamaan (Presisi) dalam Sampel.....	42
4.12 Uji Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi.....	43

**BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan.....45  
5.2 Saran.....45

**DAFTAR**

**ACUAN**.....46



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Fase Gerak Gradien.....	16
Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Uji Kesesuaian Sistem Karbaril.....	31
Tabel 4.2 Uji Linearitas Karbaril.....	32
Tabel 4.3 Uji Kecermatan (Akurasi) Karbaril.....	34
Tabel 4.4 Uji keseksamaan (Presisi) Karbaril.....	35
Tabel 4.5 Uji Stabilitas Karbaril.....	36
Tabel 4.6 Orientasi SPE.....	37
Tabel 4.7 Uji Kecermatan (Akurasi) Karbaril dalam Sampel.....	41
Tabel 4.8 Uji keseksamaan (Presisi) Karbaril dalam Sampel.....	42
Tabel 4.9 Hasil Pengukuran Uji perolehan Kembali dari Sampel Simulasi.....	43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Kimia Karbaril.....	5
Gambar 2.2 Struktur Kimia BDMC.....	7
Gambar 2.3 Reaksi Hidrolisis dan Derivatisasi Golongan N-metilkarbamat.....	12
Gambar 4.1 Kromatogram Campuran Standar karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 109,0 ng/mL.....	32
Gambar 4.2 Kurva Kalibrasi Standar Karbaril.....	34
Gambar 4.3 Kromatogram Campuran Karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 100,9 ng/mL Hasil Uji SPE Aminopropil.....	39
Gambar 4.4 Kromatogram Campuran Karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 109,0 ng/mL Hasil Uji SPE C-18.....	39
Gambar 4.5 Kromatogram Campuran Karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 100,9 ng/mL Hasil Ekstraksi Sampel Simulasi Tomat Merah Organik.....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Ekstraksi Sampel Simulasi.....	50
Lampiran 2. Skema Pemurnian dengan SPE.....	51
Lampiran 3. Skema Ekstraksi Untuk Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi.....	52
Lampiran 4. Skema Pemurnian dengan SPE untuk Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi.....	53
Lampiran 5. Cara Perhitungan Efisiensi Kolom.....	54
Lampiran 6. Cara Perhitungan Resolusi (R).....	55
Lampiran 7. Cara Perhitungan Faktor Ikutan (Tf).....	56
Lampiran 8. Cara Perhitungan Persamaan Garis Linear (Linieritas).....	57
Lampiran 9. Cara Perhitungan Perolehan Kembali (Akurasi).....	58
Lampiran 10. Cara Perhitungan Simpangan Baku (SD).....	59
Lampiran 11. Instrumentasi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	60
Lampiran 12. Sampel Tomat Merah Organik.....	61
Lampiran 13. Filtrat Sampel Tomat Merah Organik.....	62
Lampiran 14. Hasil Ekstraksi Setelah Penambahan Garam NaCl.....	63
Lampiran 15. Proses Pemurnian Sampel dengan SPE Aminopropil.....	64
Lampiran 16. Sertifikat Analisis Karbaril.....	65
Lampiran 17. Sertifikat Analisis BDMC.....	66

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Dewasa ini telah diakui bahwa penggunaan pestisida baik di negara-negara maju maupun yang sedang berkembang telah terbukti berhasil meningkatkan hasil produksi pertanian, dan juga merupakan metode efektif, relatif sederhana dan cepat dalam pengendalian hama. Penggunaan pestisida sebagai pembunuh hama tanaman meningkat seiring dengan meningkatnya kebutuhan pangan di dunia karena bertambahnya jumlah penduduk. Dalam memenuhi kebutuhan pangan dan meningkatkan kebutuhan gizinya, manusia sering mengonsumsi buah-buahan sebagai salah satu sumber vitamin. Produktivitas buah-buahan dapat terganggu oleh adanya serangan berbagai jenis hama tanaman sehingga dapat menurunkan kuantitas dan kualitas buah-buahan. Salah satu usaha agar produktivitas buah-buahan dapat ditingkatkan, diperlukan tindakan pengendalian hama yang efektif dan efisien. Metode pengendalian hama yang dipergunakan oleh petani buah-buahan saat ini adalah perlakuan dengan pestisida organik sintetik. Pestisida sering digunakan sebagai pilihan utama untuk memberantas hama tanaman karena pestisida mempunyai daya bunuh yang tinggi, penggunaannya mudah dan hasilnya cepat diketahui (Handoko & Sukarno, 1979; Wudianto, 2006).

Pestisida merupakan bahan kimia, campuran bahan kimia, atau bahan-bahan lain yang bersifat bioaktif. Pada dasarnya pestisida adalah racun, dan setiap racun berpotensi mengandung bahaya. Salah satu golongan pestisida yang biasa digunakan oleh petani buah adalah dari golongan karbamat (Djojsumarto, 2008). Penggunaan pestisida yang intensif oleh petani menyebabkan kemungkinan adanya residu pestisida dalam buah-buahan, terutama buah-buahan yang biasa dikonsumsi dalam bentuk bahan mentah seperti tomat merah.

Karbaril (1-naftil-N-methylcarbamate) adalah salah satu insektisida karbamat yang bersifat racun bagi manusia. Karbaril merupakan perintang asetilkolinesterase yang reversible dan dalam tubuh manusia sangat cepat dimetabolisme menjadi 1-naftol. (Djojsumarto, 2008; Tarumingkeng, 1992). Karbaril memiliki nilai LD<sub>50</sub> oral akut pada tikus sebesar 200-850 mg/kg. Tanda-tanda atau gejala keracunan pestisida karbaril antara lain mengeluarkan keringat berlebihan, sakit kepala, lemah, pusing, mual, muntah, nyeri perut, penglihatan kabur, bicara melantur dan otot berkedut (IPCS, 1992).

Karbaril banyak digunakan dalam bidang pertanian termasuk tanaman hias, rumput, buah-buahan dan sayuran untuk mengendalikan beberapa tanaman. Adanya residu dalam buah-buahan, sayuran, tanah dan permukaan air berpotensi membahayakan kesehatan konsumen (Santalad et al., 2008). Oleh karena itu, sebuah metode sederhana, sensitif dan dapat diandalkan untuk menganalisis residu pestisida karbaril dalam sampel sangat diperlukan.

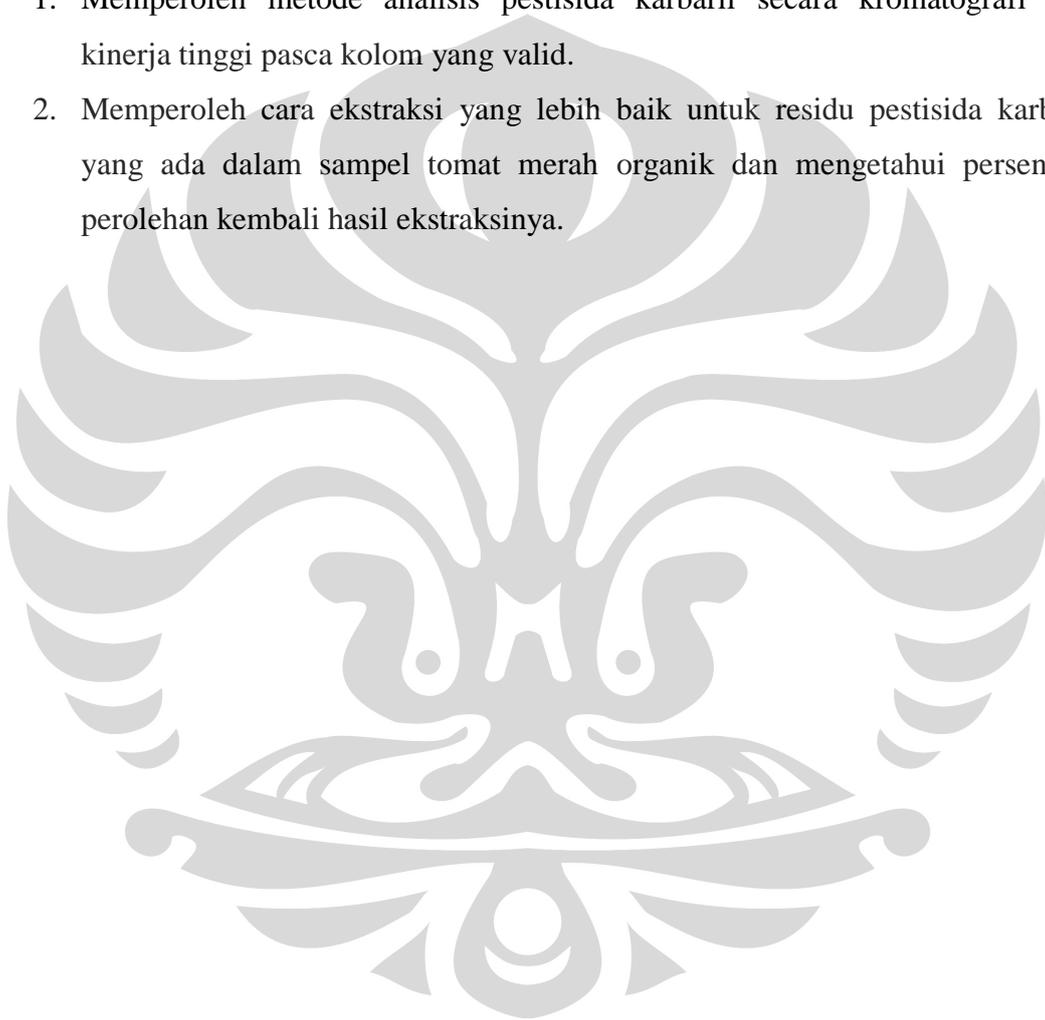
Pestisida golongan karbamat dicirikan dengan kerentanan terhadap degradasi termal yang mempersulit penentuan secara kromatografi gas atau cara lain yang melibatkan suhu tinggi secara signifikan. Analisis residu pestisida N-metilkarbamat secara langsung dengan Kromatografi Gas (KG) harus dihindari karena sifatnya yang termolabil, dapat terdekomposisi pada suhu normal yang digunakan pada KG. Metode lain yang dapat digunakan untuk menentukan kandungan pestisida karbaril adalah secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), baik dengan deteksi UV/Vis absorbansi atau fluoresensi. Pada dasarnya senyawa karbamat tidak dapat berfluoresensi. Meskipun karbaril merupakan senyawa yang berpendar, namun intensitas fluoresensinya relatif rendah. Disamping itu, residu pestisida yang terkandung dalam buah-buahan biasanya terdapat dalam jumlah kecil. Oleh karena itu, senyawa tersebut perlu direaksikan dengan suatu senyawa lain (derivatisasi) agar dapat lebih berfluoresensi. Derivatisasi diikuti oleh pengukuran secara fluorometri adalah cara lain yang berguna untuk mendeteksi karbaril. KCKT merupakan teknik alternatif yang relatif mudah, meskipun sensitivitasnya kurang. Oleh karena itu, untuk meningkatkan sensitivitas, maka dilakukan derivatisasi pasca kolom terhadap

**Universitas Indonesia**

metilamin (hasil hidrolisis karbamat) dalam lingkungan alkalis dengan ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol menjadi senyawa yang berfluoresensi, sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluoresensi (Komisi Pestisida, 1997; Massey, Engelen & Warner, 1995).

## **1.2 Tujuan Penelitian**

1. Memperoleh metode analisis pestisida karbaril secara kromatografi cair kinerja tinggi pasca kolom yang valid.
2. Memperoleh cara ekstraksi yang lebih baik untuk residu pestisida karbaril yang ada dalam sampel tomat merah organik dan mengetahui persentase perolehan kembali hasil ekstraksinya.



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Pestisida

Pestisida adalah bahan-bahan kimia yang digunakan untuk mengendalikan populasi jasad hidup yang merugikan manusia, ternak dan sebagainya yang diusahakan manusia untuk kesejahteraan hidupnya, agar kerugian dan gangguan dapat ditekan seminimum mungkin. Kata pestisida berasal dari kata *pest* berarti hama, sedangkan *cide* berarti membunuh (Tarumingkeng, 1992).

Berbagai pestisida yang dikenal terutama dalam bidang pertanian dan kesehatan veteriner adalah insektisida (racun serangga), fungisida (racun cendawan/jamur), herbisida (racun gulma/tumbuhan pengganggu), akarisisida (racun tungau dan caplak), rodentisida (racun binatang pengerat), nematisida (racun nematode), helmintisida (racun pembunuh cacing) dan termitisida (insektisida pembunuh rayap) (Tarumingkeng, 1992).

Menurut Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 7 pasal 1 ayat (a) Tahun 1973 tentang pengawasan atas peredaran, penyimpanan, dan penggunaan pestisida, pestisida adalah semua zat kimia dan bahan lain yang digunakan untuk (Komisi Pestisida, 1997):

1. Memberantas dan mencegah hama-hama dan penyakit-penyakit yang merusak tanaman, bagian tanaman atau hasil-hasil pertanian.
2. Memberantas rerumputan
3. Mematikan daun dan mencegah pertumbuhan yang tidak diinginkan.
4. Mengatur atau merangsang pertumbuhan tanaman atau bagian-bagian tanaman tidak termasuk pupuk.
5. Memberantas atau mencegah hama-hama luar pada hewan piaraan dan ternak.
6. Memberantas atau mencegah hama-hama air.
7. Memberantas atau mencegah binatang-binatang dan jasad-jasad renik dalam rumah tangga, bangunan, dan dalam alat-alat pengangkutan.

8. Memberantas atau mencegah binatang-binatang yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia atau binatang yang perlu dilindungi dengan penggunaan pada tanaman, tanah, atau air.

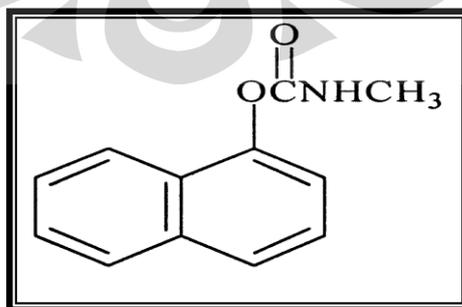
Cara kerja pestisida terbagi menjadi beberapa macam (Sudarmo, 1988):

1. Pestisida kontak, berarti mempunyai daya bunuh setelah jasad sasaran terkena pestisida.
2. Pestisida fumigan, berarti mempunyai daya bunuh setelah jasad sasaran terkena uap atau gas dari pestisida.
3. Pestisida sistemik, berarti dapat ditranslokasikan melalui jaringan tanaman. Hama akan mati apabila mengisap atau memakan jaringan tanaman.
4. Pestisida lambung, berarti mempunyai daya bunuh setelah jasad sasaran memakan pestisida.

## 2.2 Insektisida Karbamat

Insektisida dari golongan karbamat adalah racun syaraf yang bekerja dengan cara menghambat asetilkolinesterase. Pada golongan organofosfat hambatan tersebut bersifat *irreversible* (tidak bisa dipulihkan), sedangkan pada golongan karbamat hambatan tersebut bersifat *reversible* (dapat dipulihkan). Karbamat relatif mudah diurai dilingkungan (tidak persisten) dan tidak terakumulasi oleh jaringan lemak hewan (Djojsumarto, 2008; Gupta, 2006).

### 2.2.1 Karbaril (Djojsumarto, 2008; Tarumingkeng, 1992; IPCS, 1994).



[Sumber: Abad et al., 1999]

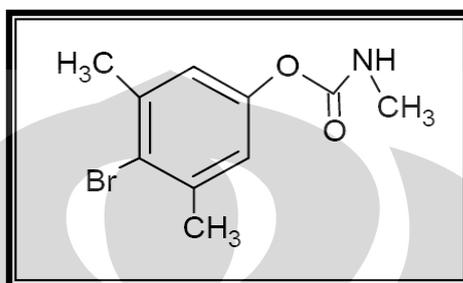
Gambar 2.1. Struktur kimia karbaril

IUPAC	: 1-naphthyl methylcarbamate
AC	: Carbaryl
Rumus Molekul	: $C_{12}H_{11}NO_2$
Berat Molekul	: 201,2
Sinonim	: 1-Naphthyl-N-methylcarbamate; $\alpha$ -Naphthyl-N-methylcarbamate; 1-Naphthalenol methyl-carbamate; methylcarbamic acid; 1-naphthyl ester.
Nama dagang	: Sevin, Arilat, Carbatox, Dicarbam, Carbamine, Denapon, Hexavin, Karbaspray, Nac, Ravyon, Septene, Tercyl, Tricarnam, dan Union Carbide 7744.
Karakteristik fisik	: kristal putih dengan titik leleh $142^{\circ}C$ .
Kelarutan	: dalam air (40 g/100 mL); dimetil formamida (45 g/100 mL); aseton dan sikloheksanon (25 g/100 mL); metiletil keton (20 g/100 mL); diklormetan (15 g/100 mL); etanol dan etil asetat(10 g/100 mL); kerosin (1 g/100 mL).
Stabilitas	: tidak tahan terhadap lingkungan alkali.
Aktivitas	: insektisida.

Karbaril (1-Naftil-N-methylcarbamate) merupakan pestisida karbamat berspektrum lebar yang ditemukan pada tahun 1957. Meskipun bukan karbamat yang pertama kali ditemukan, karbaril bisa dikatakan sebagai karbamat pertama yang sukses di pasaran. Karbaril banyak digunakan dalam bidang pertanian termasuk tanaman hias, rumput, buah-buahan dan sayuran untuk mengendalikan beberapa tanaman. Karbaril bersifat racun bagi manusia, merupakan perintang asetilkolinesterase yang *reversible* dan dalam tubuh manusia sangat cepat dimetabolisme menjadi 1-naftol (Djojoseumarto, 2008; Santalad et al, 2008; Tarumingkeng, 1992). Karbaril memiliki nilai  $LD_{50}$  oral akut pada tikus sebesar 200-850 mg/kg. Tanda-tanda atau gejala keracunan pestisida karbaril antara lain berkeringat berlebihan, sakit kepala, lemah, pusing, mual, muntah, nyeri perut, penglihatan kabur, bicara melantur dan otot berkedut (IPCS, 1992).

### 2.2.2 BDMC (4-bromo-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat) (Indrawati, 2009; LCTech, 2009)

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



[Sumber: Sigma Aldrich, 2010]

Gambar. 2.2 Struktur kimia BDMC

### 2.2.3 Mekanisme Peracunan

Insektisida karbamat memiliki suatu aksi toksik yang analog dengan insektisida organofosfat yaitu dikaitkan dengan ketidakaktifan enzim asetilkolinesterase. Enzim ini memutus neurotransmitter (penghantar syaraf) asetil kolin pada sinaps. Asetilkolin merupakan komponen essensial dalam transmisi impuls pada system syaraf mamalia dan serangga. Asetilkolin meneruskan impuls pada celah sinaps. Selanjutnya asetilkolin dihidrolisis oleh asetilkolinesterase menjadi kolin. Dalam keadaan tidak terdapat asetilkolinesterase, asetilkolin yang dihasilkan berakumulasi sehingga terjadi gangguan transmisi impuls, yang menyebabkan menurunnya koordinasi otot-otot, konvulsi dan bahkan kematian. Karbamat merupakan penghambat asetilkolinesterase yang *reversible* karena enzim aktif dapat diregenerasi dari kompleks penghambat enzim (Tarumingkeng, 1992; Connell & Gregory, 1995; Gupta, 2006).

Gejala keracunan pestisida karbamat yaitu mula-mula penderita nampak berkeringat, pusing, badan terasa lemah, dada sesak kemudian timbul kejang abdominal dan muntah. Gejala-gejala cepat terlihat dan membaik sesudah satu sampai dua jam, gejala ini mirip keracunan organofosfat tetapi reaksi cepat dan

hilangnya cepat sehingga gejala-gejala ini tidak seluruhnya terlihat (Handoko & Sukarno, 1979).

#### 2.2.4 Pengangkutan Pestisida Dalam Tumbuhan

Pestisida menembus bagian luar tumbuhan melalui epidermis batang, kulit kayu dan akar. Derajat dan 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 lipid kutikula. Kutikula juga dapat dikatakan permeabel terhadap molekul polar. Penerobosan melalui stomata juga dapat menjadi jalur yang efektif bila terbuka pada saat pemakaiannya (Djojsumarto, 2008).

Pengambilan pestisida melalui akar dianggap merupakan tempat yang paling penting, khususnya dalam zona bulu-bulu akar. Penyerapan oleh akar terjadi lebih mudah dengan pestisida yang larut dalam air dibandingkan dengan pestisida yang larut dalam lemak. 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 (Djojsumarto, 2008).

### 2.3 Analisis Kuantitatif Pestisida Karbamat

Dengan tujuan untuk memperoleh keakuratan, efisiensi, dan biaya yang efektif dalam menganalisa residu pestisida, salah satu metode yang dapat digunakan adalah dengan alat KCKT (Kromatografi Cair kinerja Tinggi). Berbeda dengan KG (Kromatografi Gas), penggunaan KCKT untuk analisis terbatas untuk analit yang mudah menguap atau stabil pada suhu yang digunakan pada KG (Nollet, 1992). Analisis residu N-metilkarbamat secara langsung dengan Kromatografi Gas dihindari karena sifatnya yang termolabil, dapat terdekomposisi pada suhu normal yang digunakan pada KG. Oleh karena itu KCKT merupakan teknik alternatif yang relatif mudah, meskipun sensitivitasnya kurang. Untuk meningkatkan sensitivitasnya, maka dilakukan derivatisasi pasca kolom terhadap

**Universitas Indonesia**

metilamin (hasil hidrolisis karbamat) dalam lingkungan alkalis dengan ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol menjadi senyawa yang berfluoresensi, sehingga dapat dideteksi dengan detektor fluoresensi (Komisi Pestisida, 1997). Penggunaan KCKT memberikan beberapa keuntungan di antaranya waktu analisis yang singkat, penyiapan sampel sederhana, penentuan kadar dapat dalam jumlah mikro, hasil pemisahan baik, detektor sensitif dengan kolom yang selektif, kolom dapat digunakan kembali serta ideal untuk molekul besar dan ion (Harmita, 2006; Johnson & Robert, 1991).

#### **2.4 Hidrolisis dan Derivatisasi**

Derivatisasi merupakan perlakuan yang sangat penting dilakukan untuk analisis residu pestisida dengan KCKT. Alasan utama pembentukan derivatisasi adalah untuk meningkatkan sensitivitas, tetapi juga penting dalam selektivitas (mengurangi bahan pengganggu yang tidak terdeteksi) (Nollet, 1992).

Derivatisasi meliputi reaksi kimia antara suatu analit dengan reagen untuk merubah sifat fisik dan kimia dari suatu analit. Empat fungsi utama dilakukannya derivatisasi dalam KCKT adalah (Snyder, Kirkland & Glajch, 1997) :

1. Memperbaiki kemudahan dalam pendeteksian suatu analit.
2. Mengubah stuktur molekul atau polaritas dari analit untuk mendapatkan kromatogram yang lebih baik.
3. Mengubah matriks agar mendapatkan pemisahan yang lebih baik.
4. Menstabilkan analit yang sensitif.

Idealnya, suatu reaksi derivatisasi harus cepat dan kuantitatif. Kelebihan reagen harus tidak boleh mengganggu analisis atau harus dapat dihilangkan dengan mudah dari matriks yang bereaksi. Berbeda dengan KG, dimana derivatisasi pada umumnya digunakan untuk memperbaiki volatilitas atau mengubah polaritas dari suatu analit, derivatisasi pada KCKT sering digunakan untuk meningkatkan pendeteksian suatu analit (Snyder, Kirkland & Glajch, 1997).

Pertimbangan utama dalam memilih suatu metode KCKT derivatisasi untuk meningkatkan pendeteksian adalah menentukan tipe deteksi apa yang paling baik. Sebagai tambahan, pilihan deteksi pre atau pasca kolom sangat diperlukan (Snyder, Kirkland & Glajch, 1997).

Pertimbangan umum dalam memilih bahan penderivatisasi adalah (Snyder, Kirkland & Glajch, 1997) :

1. Bahan penderivatisasi harus stabil.
2. Bahan penderivatisasi dan produk samping yang terbentuk selama proses derivatisasi tidak boleh terdeteksi atau harus dapat dipisahkan dengan mudah dari analit.
3. Analit harus reaktif dengan bahan penderivatisasi pada kondisi yang sesuai.
4. Jika mungkin, bahan penderivatisasi sebaiknya bersifat non toksik.
5. Prosedur yang digunakan dapat dengan mudah disesuaikan untuk otomatisasi.

Ada 2 tipe utama untuk melakukan derivatisasi, yaitu pre kolom dan pasca kolom (Nollet, 1992) :

#### 1. Pre Kolom

Pada pre kolom derivatisasi dilakukan sebelum kromatografi. Cara ini biasa digunakan untuk membentuk bahan yang terdeteksi UV (memiliki gugus kromofor) atau berfluoresensi. Dahulu Lawrence telah menggunakan dansil klorida untuk menderivatisasi karbaril. Dansil klorida dulu dikenal tidak berfluoresensi, tetapi jika direaksikan akan menghasilkan bahan yang berfluoresensi tinggi.

Derivatisasi secara pre kolom sudah jarang digunakan karena memiliki beberapa kekurangan antara lain, proses derivatisasi dilakukan secara manual sehingga membutuhkan waktu persiapan yang cukup panjang dan hasilnya yang tidak tetap.

#### 2. Pasca Kolom

Derivatisasi pasca kolom terjadi setelah analit terpisah. Awalnya, teknik ini memiliki masalah karena pelebaran pita, tetapi sudah teratasi dan menjadi prosedur derivatisasi pilihan untuk residu. Pemilihan jenis reaktor ditentukan apakah jenis reaksi yang didapat dalam reaktor.

Reaktor pasca kolom dapat diklasifikasikan dalam empat kelompok:

##### a. Tubular terbuka

Reaktor ini terdiri dari sebuah pipa (lurus atau gulungan) yang terbuat dari PTFE, gelas, quarsa atau *stainless steel*. Dirancang dengan terbaik untuk

**Universitas Indonesia**

kecepatan gerakanya (1 menit atau kurang), meskipun pipanya dapat dirancang untuk reaksi yang lambat (beberapa menit).

b. *Packed bed*

Packed bed merupakan reaktor padat pertama berisi pipa *stainless steel* dengan gelas inert yang menyerap butiran dimana secara keseluruhan dijalankan untuk menghalangi pelebaran pita dengan reaksi selama 0,5-4 menit. Pembungkusan sebenarnya mengambil bagian dari reaksi derivatisasi dimana tidak hanya memotong pelebaran peak, tetapi mengurangi kebutuhan pompa dan reagen yang tidak dapat digunakan lagi.

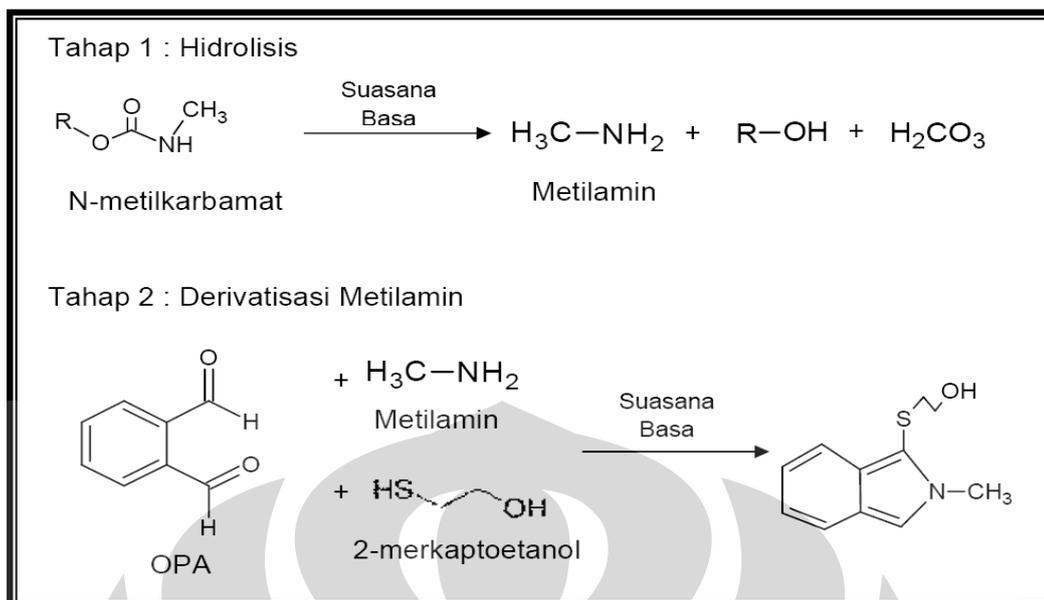
c. *Segmented stream*

Reaktor ini dirancang untuk analisis aliran kontinyu. Pipa pada tipe dari reaktor ini dapat menurunkan secara drastis pelebaran pita.

d. *Hollow-fiber membrane*

*Hollow-fiber membrane reactor porous* dan *hollow fiber membrane* yang digunakan untuk mengantarkan reagen. Bekerja dengan sebuah pompa dan mencampur awalan dan mengurangi pelebaran pita ekstra kolom.

Reaksi pasca kolom untuk analisis pestisida dengan KCKT dimulai oleh Moyer et al pada tahun 1977. Penelitian grup ini pertama-tama dengan menggunakan reaksi amin primer dengan ortoftalaldehid (OPA) dan 2-merkaptotanol untuk membentuk senyawa kompleks yang berfluoresensi dari insektisida N-metilkarbamat. Karbamat mula-mula dihidrolisis secara pasca kolom dengan NaOH untuk membentuk metilamin, kemudian direaksikan dengan ortoftalaldehid (OPA) dan 2-merkaptotanol untuk membentuk senyawa kompleks yang berfluoresensi (Nollet, 1992).



[Sumber: Waters Corporation, 2003]

Gambar 2.3. Reaksi hidrolisis dan derivatisasi golongan N-metilkarbamat

## 2.5 Reaktor Pasca Kolom

Reaktor pasca kolom terdiri dari oven yang berisi RXN<sup>TM</sup> 1000 *reaction coil* dan CHEX<sup>TM</sup> penukar panas lawan arus. RXN<sup>TM</sup> *coil* terbuat dari politetrafluoroetilen (PTFE) 0,018 inci dengan volume 1000  $\mu\text{L}$ . Analit yang keluar dari kolom dipanaskan terlebih dahulu oleh CHEX untuk menuju oven reaktor pasca kolom. Pada persimpangan pertama dalam oven reaktor, aliran dari kolom bergabung dengan aliran dari reagen pertama yang juga telah dipanaskan oleh CHEX<sup>TM</sup>. Kedua aliran ini bercampur dan menuju RXN<sup>TM</sup> 1000 *reaction coil* dimana volume coil 1 mL dijaga pada temperatur konstan untuk terjadinya reaksi. Setelah keluar dari *coil*, aliran segera masuk pada persimpangan dimana akan bergabung dengan reagen kedua sehingga reaksi pasca kolom tahap dua terjadi. Selanjutnya aliran ini akan meninggalkan oven, didinginkan hingga temperatur lingkungan dengan melewatinya pada CHEX<sup>TM</sup>, kemudian meninggalkan reaktor pasca kolom dan menuju detektor (Waters Corporation, 1999).

## 2.6 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

### 2.6.1 Teori Dasar

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu prosedur dimana zat terlarut dipisahkan oleh perbedaan proses migrasi yang dinamis dalam suatu sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satunya bergerak terus menerus dalam arah yang telah ditentukan dimana zat akan terpisah karena adanya perbedaan adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kepadatan muatan ion. Zat yang telah dipisahkan dapat diidentifikasi atau ditentukan berdasarkan prosedur analisis (The United State Pharmacopoeia XXX, 2007).

Kromatografi cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah suatu teknik pemisahan berdasarkan fase diam dan fase gerak. Pemisahan dicapai melalui proses partisi, adsorpsi atau pertukaran ion, tergantung dari tipe fase diam yang digunakan. KCKT memiliki keuntungan lebih banyak dibandingkan Kromatografi Gas (KG) untuk menganalisis senyawa-senyawa organik (The United State Pharmacopoeia XXX, 2007).

### 2.6.2 Detektor Fluoresensi

Ada 2 keuntungan utama detektor fluoresensi untuk KCKT, yaitu batas deteksi lebih baik untuk banyak senyawa dan sering kali selektivitas diperbaiki (Johnson & Robert, 1991).

Variabel Yang Mempengaruhi Fluoresensi antara lain (Gandjar & Abdul, 2007) :

#### a. 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 ( $\Phi$ ) yang diharapkan adalah mendekati 1, yang berarti efisiensi fluoresensi sangat tinggi.

#### b. Pengaruh Kekakuan Struktur

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

c. Pengaruh Suhu

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

d. Pengaruh Pelarut

Jika pelarut makin polar, maka intensitas fluoresensi makin besar.

e. Pengaruh pH

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

f. Pengaruh Oksigen Terlarut

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

g. Pemadaman Sendiri (*Self Quenching*)

Pemadaman sendiri disebabkan oleh tabrakan-tabrakan antar molekul zat itu sendiri. Tabrakan-tabrakan itu menyebabkan energi yang tadinya akan dilepaskan sebagai sinar fluoresensi dipindahkan ke molekul lain, akibatnya intensitas berkurang.

### 2.6.3 Dasar Perhitungan Kuantitatif (Harmita, 2006).

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Metode yang dapat digunakan, yaitu:

a. Baku Luar (*External Standard*)

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Buat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran.

b. Baku Dalam (*Internal Standard*)

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi

**Universitas Indonesia**

tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Buat kurva baku antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva kalibrasi standar. Keuntungan dari cara ini adalah kesalahan volume injeksi dapat dieliminasi, namun diperlukan baku dalam yang tepat. Persyaratan yang dimiliki oleh baku dalam untuk analisis secara kromatografi antara lain: tidak terdapat didalam sampel, tersedia dalam kemurnian yang cukup, stabil, harus menyerupai analit (memiliki sifat yang sama dengan analit).

#### 2.6.4 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 *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP). Kolom dikatakan makin efisien apabila harga HETP makin kecil.

##### 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.

## 2.7 Metode Analisis Residu Pestisida N-Metilkarbamat

### 2.7.1 Karbamat dalam Buah-buahan (Waters Corporation, 2008).

Tabel 2.1. 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

[Sumber: Waters Coporation, 2008]

Menggunakan kolom analisis karbamat 3,9 x 150 mm, laju alir fase gerak 1,5 mL/menit, volume penyuntikan 400  $\mu$ L, laju reaktor pasca kolom 0,5 mL/menit, detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm.

### 2.7.2 Analisis Pestisida Karbamat dan Fenilurea Menggunakan Sistem MD800 LCD HPLC-MS (VG MassLab, 1992).

Menggunakan MD800 LCD HPLC-MS; *Carbamate Analysis Column* (Waters) RPB-18 dengan ukuran 3.9 x 150 mm; fase gerak: air-asetonitril-metanol (60:20:20); dan laju alir 1 mL/min.

### 2.7.3 Metode Analisis residu pestisida N-Metilkarbamat secara Kromatografi Gas (KG). (Komisi Pestisida, 1997).

Menggunakan detektor penangkap electron (ECD)  $^{63}\text{Ni}$ , gas pembawa nitrogen, kolom gelas (1,8 m x 4 mm) berisi 10% DC-200 pada penyangga

Anakrom ABS, suhu kolom 232°C, suhu detektor 250°C, laju alir 80 mL/menit, pereaksi 1-fluoro-2,4-dinitrobenzena, dan volume penyuntikan 10 µL.

## 2.8. SPE

Teknik SPE pertama kali diperkenalkan pada pertengahan tahun 1970-an dan tersedia secara komersial pada tahun 1978. Dalam beberapa tahun terakhir, banyak inovasi yang diterapkan dan telah dikembangkan pada proses analisis dalam menyiapkan sampel makanan dan lingkungan untuk ekstraksi dan penentuan residu pestisida. Telah diakui bahwa saat ini metode klasik dapat diganti dengan prosedur yang lebih cepat, lebih murah, dan sama atau lebih baik daripada metode klasik. Meskipun kebanyakan metode untuk analisis pestisida menggunakan ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat (SPE) telah dikembangkan sebagai alternatif karena memiliki nilai kesederhanaan dan ekonomis dalam hal waktu dan kebutuhan pelarut. Teknik SPE ini telah diterima secara luas karena kelemahan dari ekstraksi cair-cair, diantaranya tidak mudah untuk mengekstraksi pestisida yang bersifat polar, sulit, memakan waktu, mahal, memiliki kecenderungan untuk membentuk emulsi, membutuhkan penguapan dari pelarut bervolume besar dan pembuangan bahan kimia yang beracun atau mudah terbakar (Pico et al., 2007)

*Solid Phase Extraction* (SPE) adalah teknik yang paling penting yang digunakan dalam penyiapan sampel untuk KCKT. SPE merupakan proses pemisahan analit dari gangguan-gangguan yang terdapat dalam fraksi analit, sangat efisien sehingga mudah untuk memperoleh hasil perolehan kembali yang tinggi dari analit (Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997).

SPE memiliki beberapa keuntungan, antara lain (Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997):

- a. Lebih lengkap dalam mengekstraksi analit.
- b. Lebih efisien dalam memisahkan analit dari gangguan-gangguan.
- c. Mengurangi pemakaian pelarut organik.
- d. Mudah mengumpulkan fraksi total dari analit.
- e. Prosedur manual yang lebih mudah.
- f. Dapat menghilangkan partikulat dengan baik.

## 2.9 Validasi Metode Analisis (Harmita, 2006; The United State Pharmacopoeia XXX, 2007).

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

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metoda analisis adalah:

### 1. Kecermatan (*accuracy*)

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 ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi / absolut (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku / adisi (*standard addition method*).

Pada metode simulasi, persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksipien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 20–80 % dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui, maka dapat dipakai metode adisi. Metode adisi dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan.

### 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*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Sedangkan ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

### 3. Selektivitas (spesivitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat 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, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variasi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit.

Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50–150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0–200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $y = a + bx$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan.

#### 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. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

##### a. Batas deteksi /*Limit of Detection* (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{3S_{y/x}}{b}$$

##### b. Batas kuantitasi /*Limit of Quantitation* (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{10S_{y/x}}{b}$$

Keterangan :

$b$  = simpangan baku respon analitik dari blanko

$S_{y/x}$  = arah garis linier persamaan garis  $y = a + bx$

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian dilakukan pada bulan Januari-Mei 2010 di Laboratorium Kesehatan Lingkungan, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Indonesia.

#### **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; vial (*Waters Screw Neck Vial 12 x 32 mm PTFE/silicone septa*); penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$  (*Waters & Gelman*); pompa vakum (*Waters*); pengaduk ultrasonik (*Branson 1510*); SPE aminopropil (*Waters Sep-pak Aminopropyl Cartridges*); SPE C-18 (*Waters Sep-pak C-18 Cartridges*); PTFE (*Waters 0,45  $\mu\text{m}$* ); timbangan analitik (*And GR-200*); pengaduk magnetik (*Sybron*); penangas air; kertas saring (*Whatman*); spuit (5 cc dan 10 cc); pipet eppendorf 1000  $\mu\text{L}$ ; labu ukur; gelas ukur; gelas piala; pipet tetes, aluminium foil; botol coklat bertutup.

#### **3.3 Bahan**

Standar karbaril 100  $\mu\text{g/mL}$  (*Accu standard, USA*); baku dalam 4-bromo-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat (*Supelco, USA*); aquabidest (*PT Ikapharmindo Putramas, Indonesia*); asetonitril *gradient grade for Liquid Chromatography* (*Merck, Indonesia*); metanol *gradient grade for Liquid Chromatography* (*Merck, Indonesia*); kalium dihidrogen sitrat (*Sigma Aldrich, Jerman*); natrium tiosulfat (*Merck, Indonesia*); natrium hidroksida (*Merck, Indonesia*); natrium klorida (*Merck, Indonesia*); diklormetan *for Liquid Chromatography* (*Merck, Indonesia*); ortoftalaldehid 97% (*Sigma, Austria*); 2-merkaptotanol *for syntetis* (*Merck,*

Jerman); natrium tetraborat pentahidrat (Merck, Jerman); sampel tomat merah organik (Orion, Indonesia)

### **3.4 Cara Kerja**

#### **3.4.1 Pembuatan Larutan Standar**

##### **3.4.1.1 Larutan Stok Standar Karbaril 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$**

Dari larutan standar karbaril 100,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diambil sebanyak 100  $\mu\text{L}$ , dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas. Disimpan dalam botol coklat, ditutup rapat sehingga terhindar dari kelembaban dan cahaya, kemudian disimpan dalam freezer pada suhu  $< -10^{\circ}\text{C}$ . Dilakukan pengenceran dari larutan stok untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

##### **3.4.1.2 Larutan Stok Baku Dalam 4-bromo-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat (BDMC) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$**

Sebanyak 10 mg standar BDMC ditimbang dengan seksama, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan asetonitril sampai tanda batas. Disimpan dalam botol coklat, ditutup rapat sehingga terhindar dari kelembaban dan cahaya, kemudian disimpan dalam freezer pada suhu  $< -10^{\circ}\text{C}$ . Dilakukan pengenceran dari larutan induk untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah.

#### **3.4.2 Pembuatan Larutan Pereaksi**

##### **3.4.2.1 Larutan Kalium Dihidrogen Sitrat (digunakan untuk pengenceran larutan standar stok karbaril dan BDMC)**

Sebanyak 9,35 g kalium dihidrogen sitrat dicampur dengan 200 mg natrium tiosulfat yang telah ditimbang dengan seksama. Campuran kedua bahan tersebut dilarutkan dalam aquabidest hingga 1 L.

##### **3.4.2.2 Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 0,05 N**

Sebanyak 1 gram natrium hidroksida ditimbang dengan seksama, kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga 500 mL, diaduk hingga homogen. Larutan

disaring dengan penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$ , kemudian didegas menggunakan ultrasonik selama lebih kurang 15 menit. Larutan ini harus selalu dibuat baru.

#### 3.4.2.3 Stok Buffer (0,05 M natrium borat)

Sebanyak 19,1 gram natrium tetraborat pentahidrat ditimbang dengan seksama, kemudian dilarutkan dengan 1 L aquabidest didalam gelas piala dengan bantuan pengaduk magnetik selama lebih kurang 30 menit. Larutan stok ini dapat disimpan didalam botol tertutup untuk digunakan dimasa yang akan datang dalam jangka waktu kurang dari 3 bulan setelah masa pembuatan.

#### 3.4.2.4 Reagen Ortoftalaldehid (OPA)

Sebanyak 50 mg ortoftalaldehid ditimbang dengan seksama, kemudian dilarutkan dalam 5 mL metanol dalam gelas piala sambil diputar perlahan hingga ortoftalaldehid larut. Selanjutnya larutan dipindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan dengan stok buffer borat, dicampur dengan seksama. Larutan disaring dengan penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$ . Larutan dipindahkan kedalam reservoir pelarut wadah gelas tertutup dan terbungkus dengan aluminium foil untuk melindunginya dari cahaya, kemudian didegas dengan menggunakan ultrasonik selama lebih kurang 15 menit. Kemudian ditambahkan 2-merkaptotanol sebanyak 500  $\mu\text{L}$ , dikocok perlahan hingga bercampur dengan baik. Larutan ini harus selalu dibuat baru.

#### 3.4.2.5 Fase Gerak

Fase gerak air disaring dengan penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$  menggunakan pompa vakum. Kemudian didegas menggunakan ultrasonik selama lebih kurang 15 menit. Sedangkan untuk pelarut organik (metanol dan asetonitril) digunakan penyaring membran organik 0,45  $\mu\text{m}$ . Kemudian didegas menggunakan ultrasonik selama lebih kurang 15 menit.

### 3.4.3 Kondisi Analisis

Larutan campuran standar karbaril dan BDMC konsentrasi 100,0 ng/mL disuntikkan sebanyak 100,0  $\mu$ L kedalam alat KCKT dengan menggunakan fase gerak air-metanol-asetonitril secara gradien dengan komposisi seperti yang tertera pada tabel 2.1. Kecepatan alir yang digunakan adalah 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 dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm.

### 3.4.4 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran standar karbaril dan BDMC dengan konsentrasi 100,0 ng/mL sebanyak 100,0  $\mu$ L disuntikkan ke dalam alat KCKT dengan menggunakan fase gerak air-metanol-asetonitril secara gradien dengan komposisi seperti yang tertera pada tabel 2.1. Kecepatan alir yang digunakan adalah 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 dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm. Prosedur diulangi sebanyak 5 kali. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan efisiensi kolom (N dan HETP), faktor ikutan (Tf), resolusi (R) dan koefisien variasi keterulangan.

### 3.4.5 Uji Linearitas

Larutan campuran standar karbaril dengan konsentrasi 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 dan 100,0 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 100,0 ng/mL masing-masing sebanyak 100,0  $\mu$ L disuntikkan ke dalam alat KCKT. Perbandingan luas puncak yang diperoleh dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya antara PAR dan konsentrasi, kemudian dihitung koefisien korelasinya (r) serta ditentukan harga LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantitation*).

### 3.4.6 Uji Kecermatan (akurasi) dan Keseksamaan (presisi)

Larutan campuran standar karbaril dengan konsentrasi 20,0; 60,0 dan 100,0 ng/mL dan BDMC dengan konsentrasi 100,0 ng/mL masing-masing sebanyak 100,0  $\mu$ L disuntikkan ke dalam alat KCKT. Prosedur diulangi sebanyak

**Universitas Indonesia**

enam kali. Dari perbandingan luas puncak yang diperoleh, dihitung simpangan baku relatif dan koefisien variasinya. Konsentrasi larutan standar karbaril dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar, kemudian dihitung perolehan kembalinya dan % diffnya.

### 3.4.7 Uji Stabilitas

Larutan campuran standar karbaril dan BDMC dengan konsentrasi 100,0 ng/mL sebanyak 100  $\mu$ L disuntikkan ke dalam alat KCKT. Dari perbandingan luas puncak yang diperoleh dihitung simpangan baku relatifnya dan koefisien variansinya. Larutan disimpan dalam lemari pendingin. Prosedur diulangi pada hari kedua belas, dan kedua puluh sembilan dengan frekuensi penyuntikkan masing-masing tiga kali.

### 3.4.8 Orientasi SPE

#### 3.4.8.1 Persiapan Sampel

Sampel adalah buah tomat merah organik yang dibeli di supermarket, kemudian telah dicuci bersih dengan aquadest, dikeringkan dengan tisu, dan diambil bagian kulit serta daging buahnya.

#### 3.4.8.2 Proses Ekstraksi dan Pemurnian Sampel

Ke dalam lebih kurang 25 gram sampel ditambahkan 50 mL asetonitril., dihomogenkan selama 2-5 menit menggunakan blender, kemudian disaring dengan kertas saring. Sebanyak 40-50 mL filtrat diambil, dimasukkan kedalam corong pisah, kemudian ditambahkan larutan standar karbaril dan BDMC dengan konsentrasi 800,0 ng/mL masing-masing sebanyak 250,0  $\mu$ L. Ditambahkan 5-6 g NaCl, dikocok kuat selama 1 menit dan diamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Diambil 10,0 mL lapisan asetonitril (lapisan atas) dan diuapkan hingga kering diatas penangas air pada suhu 80°C. Direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol-diklormetan (1:99). Larutan ini disebut sebagai sampel A. Selanjutnya SPE aminopropil dilewatkan dengan 4 mL metanol-diklormetan (1:99), kemudian 2 mL sampel A dimasukkan ke dalam SPE. Larutan yang keluar dibuang. Selanjutnya dielusi dengan 2 mL metanol-diklormetan (1:99) sebanyak sepuluh

kali. Larutan yang telah melewati SPE dikumpulkan dan diuapkan hingga kering diatas penangas air pada suhu 50°C. Kemudian direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol. Disaring dengan PTFE 0,45 µm dan dimasukkan kedalam vial. Sebanyak 100 µL larutan sampel disuntikkan ke dalam alat KCKT. Dilakukan juga pada SPE C-18, kemudian hasil yang diperoleh dibandingkan.

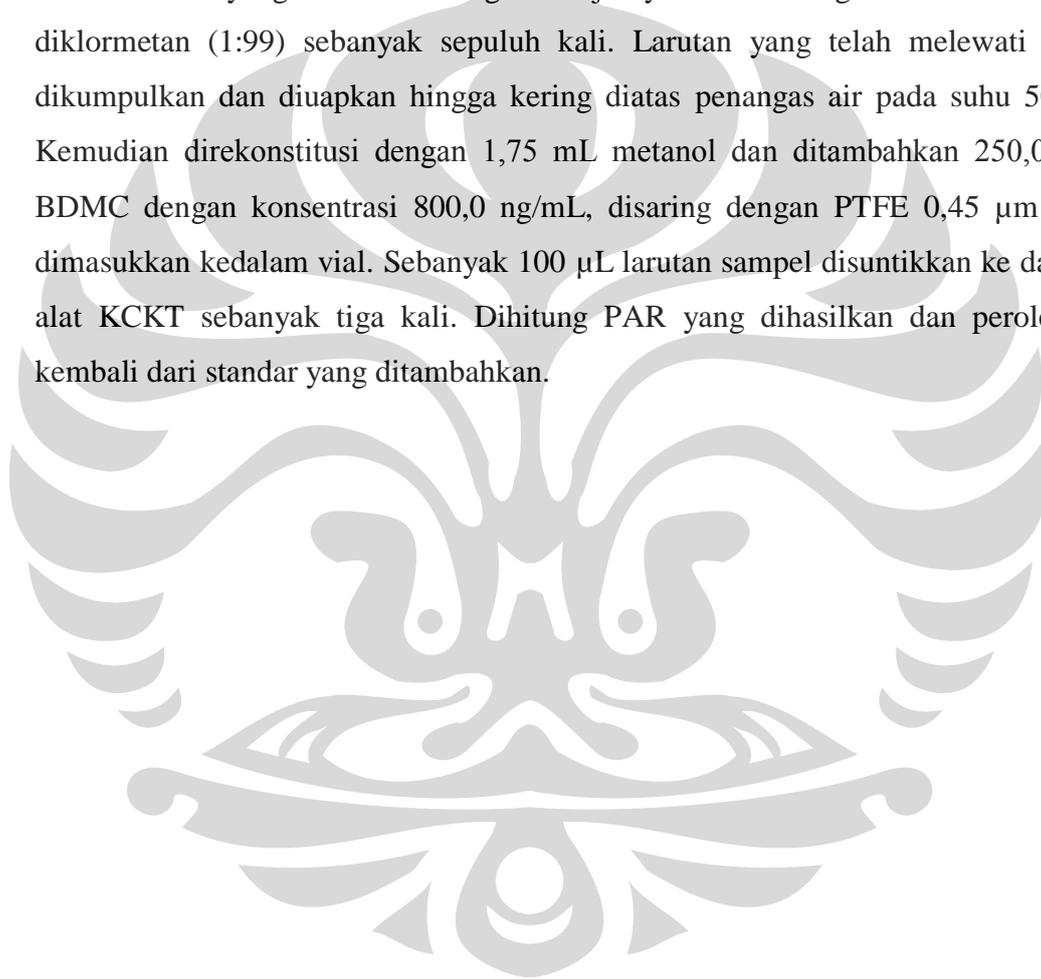
#### 3.4.9 Uji Kecermatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi) pada Sampel

Ke dalam lebih kurang 25 gram sampel ditambahkan 50 mL asetonitril, dihomogenkan selama 2-5 menit menggunakan blender, kemudian disaring dengan kertas saring. Sebanyak 40-50 mL filtrat diambil, dimasukkan kedalam corong pisah, Larutan standar karbaril dan BDMC dengan konsentrasi 800,0 ng/mL ditambahkan kedalam filtrat sampel sebanyak 250,0; 150,0 dan 100,0 µL untuk karbaril dan 250,0 µL untuk BDMC. Kemudian ditambahkan 5-6 g NaCl, dikocok kuat selama 1 menit dan diamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Diambil 10,0 mL lapisan asetonitril (lapisan atas) dan diuapkan hingga kering diatas penangas air pada suhu 80°C. Direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol-diklormetan (1:99). Larutan ini disebut sebagai sampel A. Selanjutnya SPE aminopropil dilewatkan dengan 4 mL metanol-diklormetan (1:99), kemudian 2 mL sampel A dimasukkan ke dalam SPE. Larutan yang keluar dibuang. Selanjutnya dilusi dengan 2 mL metanol-diklormetan (1:99) sebanyak sepuluh kali. Larutan yang telah melewati SPE dikumpulkan dan diuapkan hingga kering diatas penangas air pada suhu 50°C. Kemudian direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol. Disaring dengan PTFE 0,45 µm dan dimasukkan kedalam vial. Sebanyak 100 µL larutan sampel disuntikkan ke dalam alat KCKT. Penyuntikan diulang sebanyak enam kali untuk masing-masing konsentrasi. Konsentrasi larutan standar karbaril dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi standar, lalu dihitung perolehan kembalinya dan % diffnya.

#### 3.4.10 Uji Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi

Ke dalam lebih kurang 25 gram sampel ditambahkan 50 mL asetonitril dan larutan standar karbaril dengan konsentrasi 800,0 ng/mL sebanyak 250,0 µL, dihomogenkan selama 2-5 menit menggunakan blender, kemudian disaring

dengan kertas saring. Sebanyak 40-50 mL filtrat diambil, dimasukkan kedalam corong pisah. Ditambahkan 5-6 g NaCl, dikocok kuat selama 1 menit dan diamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Diambil 10,0 mL lapisan asetonitril (lapisan atas) dan diuapkan hingga kering diatas penangas air pada suhu 80°C. Direkonstitusi dengan 2,0 mL metanol-diklormetan (1:99). Larutan ini disebut sebagai sampel B. Selanjutnya SPE aminopropil dilewatkan dengan 4 mL metanol-diklormetan (1:99), kemudian 2 mL sampel B dimasukkan ke dalam SPE. Larutan yang keluar dibuang. Selanjutnya dielusi dengan 2 mL metanol-diklormetan (1:99) sebanyak sepuluh kali. Larutan yang telah melewati SPE dikumpulkan dan diuapkan hingga kering diatas penangas air pada suhu 50°C. Kemudian direkonstitusi dengan 1,75 mL metanol dan ditambahkan 250,0 µL BDMC dengan konsentrasi 800,0 ng/mL, disaring dengan PTFE 0,45 µm dan dimasukkan kedalam vial. Sebanyak 100 µL larutan sampel disuntikkan ke dalam alat KCKT sebanyak tiga kali. Dihitung PAR yang dihasilkan dan perolehan kembali dari standar yang ditambahkan.



## **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **4.1 Larutan Standar**

#### **4.1.1 Larutan Standar Karbaril**

Larutan standar karbaril yang digunakan pada penelitian ini memiliki konsentrasi 100 µg/mL dalam metanol yang dikemas dalam wadah ampul coklat. Dari larutan standar tersebut dibuat larutan stok, yaitu diambil sebanyak 100,0 µL, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas. Selanjutnya larutan stok ini disimpan dalam botol coklat dan ditutup rapat agar terhindar dari pengaruh cahaya, kemudian disimpan dalam freezer pada suhu < -10°C. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, maka dilakukan pengenceran dari larutan stok dengan menggunakan larutan kalium dihidrogen sitrat.

#### **4.1.2 Larutan Standar Baku Dalam 4-bromo-3,5-dimetilfenil-N-metilkarbamat (BDMC)**

Pada penelitian ini, standar BDMC yang digunakan adalah berupa serbuk yang dikemas dalam botol coklat bertutup. Sebanyak 10 mg standar BDMC ditimbang dengan seksama. Hasil yang ditimbang adalah sebesar 10,9 mg serbuk BDMC, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan asetonitril sampai tanda batas. Selanjutnya disimpan dalam botol coklat dan ditutup rapat agar terhindar dari pengaruh cahaya, kemudian disimpan dalam freezer pada suhu < -10°C. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, maka dilakukan pengenceran dari larutan stok dengan menggunakan larutan kalium dihidrogen sitrat.

### **4.2. Larutan Pereaksi**

Semua larutan pereaksi yang digunakan harus disaring dengan penyaring membran 0,45 µm untuk menghilangkan partikel-partikel dan harus didegas untuk menghilangkan oksigen yang dapat mempengaruhi proses analisa.

Larutan NaOH 0,05 N dan larutan ortoftalaldehid (OPA) yang digunakan harus selalu dibuat baru. Pada pembuatan larutan OPA, paparan cahaya harus dihindari karena OPA tidak stabil oleh adanya pengaruh cahaya. Oleh karena itu, penimbangan OPA dilakukan dalam ruangan dengan pencahayaan seminimal mungkin. Larutan OPA yang telah dibuat disimpan dalam wadah gelas tertutup rapat dan terbungkus aluminium foil.

### 4.3 Kondisi Analisis

Pestisida golongan karbamat rentan terdegradasi pada suhu tinggi, sehingga sulit ditentukan secara Kromatografi Gas (KG) atau cara lain yang melibatkan suhu tinggi secara signifikan. Berdasarkan literatur, terdapat beberapa metode analisis pestisida, misalnya secara KG. Namun, analisis residu pestisida N-metilkarbamat secara langsung dengan KG harus dihindari karena sifatnya yang termolabil, dapat menyebabkan terjadinya dekomposisi senyawa pada suhu normal yang digunakan pada KG. Cara lain yang dapat digunakan adalah secara Kromatografi Cair kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet. Namun detektor tersebut memiliki suatu kelemahan yaitu kurang sensitif dibandingkan detektor fluoresensi. (Komisi Pestisida, 1997; Massey, Engelen, & Warner, 1995).

Pada dasarnya senyawa karbamat tidak dapat berfluoresensi. Meskipun karbaril merupakan senyawa yang berpendar, namun intensitas fluoresensinya relatif rendah. Disamping itu, residu pestisida yang terkandung dalam buah-buahan biasanya terdapat dalam jumlah kecil. Oleh karena itu, senyawa tersebut perlu direaksikan dengan suatu senyawa lain (derivatisasi) agar dapat lebih berfluoresensi. Derivatisasi dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu pre kolom dan pasca kolom. Pada penelitian ini digunakan teknik pasca kolom dengan alasan untuk meningkatkan selektivitas dan sensitivitas karbaril, karena jika menggunakan teknik pre kolom maka besar kemungkinan semua senyawa karbamat yang sedang dianalisis akan bereaksi dengan senyawa penderivat yang digunakan dan sulit untuk menentukan senyawa apa yang terpisah melalui kolom. Pada penelitian ini, derivatisasi dilakukan secara pasca kolom terhadap metilamin (hasil hidrolisis karbamat) dalam lingkungan alkalis dengan ortoftalaldehid dan 2-merkaptotanol menjadi senyawa yang berfluoresensi tinggi sehingga dapat

dideteksi dengan detektor fluoresensi. Pestisida golongan N-metilkarbamat hanya memiliki gugus amin sekunder, maka perlu dilakukan hidrolisis dengan NaOH untuk memperoleh gugus amin primer. Derivatisasi diikuti oleh pengukuran secara fluorometri adalah cara lain yang berguna untuk mendeteksi pestisida karbaril. Selain itu, detektor fluoresensi juga memberikan batas deteksi yang lebih baik dan dapat juga memperbaiki selektivitas (Komisi Pestisida, 1997; Massey et al, 1995). Oleh karena itu, dalam penelitian ini analisis pestisida karbaril dilakukan secara KCKT pasca kolom dengan menggunakan detektor fluoresensi yang dapat memberikan sensitivitas yang cukup tinggi sehingga dapat mendeteksi residu pestisida karbaril dalam buah-buahan hingga jumlah yang sangat rendah.

Penggunaan KCKT memberikan beberapa keuntungan di antaranya waktu analisis yang singkat, penyiapan sampel sederhana, penentuan kadar dapat dalam jumlah mikro, hasil pemisahan baik, detektor sensitif dengan kolom yang selektif, kolom dapat digunakan kembali serta ideal untuk molekul besar dan ion (Harmita, 2006; Johnson & Robert, 1991). Pada penelitian ini digunakan kolom dimetiloktadesilsilil, yaitu merupakan kolom yang ditujukan khusus untuk analisis senyawa karbamat. Pemisahan kromatografi dengan kolom fase terbalik umumnya menggunakan campuran air-metanol atau air-asetonitril sebagai fase gerak dengan tujuan untuk memperoleh tingkat polaritas yang bervariasi sehingga diharapkan dapat memisahkan senyawa-senyawa derivat N-metilkarbamat dengan baik (Johnson & Robert, 1991).

Pada penelitian ini, elusi dilakukan secara gradien sesuai dengan metode EPA (Environmental Protection Agency). Kondisi analisis yang digunakan adalah sebagai berikut: kolom dimetiloktadesilsilil (Waters *Carbamate Column* 3,9 x 150 mm) dengan elusi fase gerak secara gradien seperti yang tertera pada tabel 2.1; kecepatan alir fase gerak 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; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm; volume penyuntikan 100,0 µl.

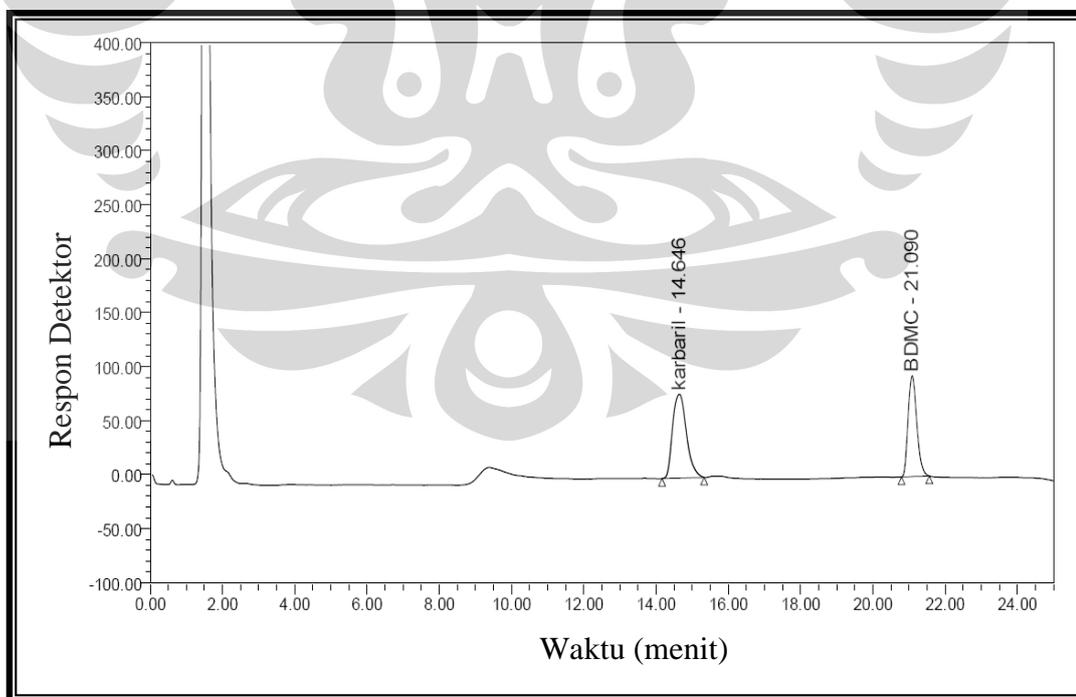
#### 4.4 Uji Kesesuaian Sistem

Berdasarkan kromatogram-kromatogram yang diperoleh dari uji kesesuaian sistem, jumlah lempeng teoritis (N) karbaril dan BDMC lebih dari 2000 dengan faktor ikutan kurang dari 2. Hal ini menunjukkan bahwa metode tersebut dapat digunakan untuk menganalisis komponen-komponen dalam sampel.

Data dan gambar selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.1. Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem karbaril

Konsentrasi (ng/ml)	Karbaril			BDMC			Resolusi
	N (pelat)	HETP (cm)	Faktor ikutan	N (pelat)	HETP (cm)	Faktor ikutan	
100	5.224,40	0,0112	1,00	14.305,53	0,0041	0,83	8,66
	5.215,01	0,0112	1,00	12.459,32	0,0047	0,83	8,37
	5.216,45	0,0112	1,00	14.568,84	0,0041	1,00	8,64
	5.204,18	0,0112	1,00	16.568,84	0,0035	1,00	8,95
	5.209,95	0,0112	1,12	14.282,30	0,0041	1,00	8,64



Gambar 4.1. Kromatogram campuran standar karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 109,0 ng/mL

#### 4.5 Uji Linearitas

Pada penelitian ini, uji linearitas karbaril menggunakan seri konsentrasi karbaril yaitu 10,00; 20,00; 40,00; 60,00; 80,00 dan 100,00 ng/mL. Data dan gambar selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.2. Uji linearitas karbaril

Konsentrasi (x)	Luas Puncak		PAR (y)	PAR Terukur ( $\hat{y}$ )	$\frac{\Delta y}{\Delta x}$	$(\hat{y}-y)^2$
	Karbaril	BDMC				
10	203.026	1.468.398	0,1383	0,1344	0,0138	$1,521 \times 10^{-5}$
20	423.283	1.495.452	0,2830	0,2844	0,0150	$0,196 \times 10^{-5}$
40	854.939	1.442.470	0,5927	0,5844	0,0155	$6,889 \times 10^{-5}$
60	1.261.535	1.455.377	0,8668	0,8844	0,0137	$30,976 \times 10^{-5}$
80	1.767.210	1.498.405	1,1794	1,1844	0,0156	$2,500 \times 10^{-5}$
100	2.243.535	1.501.641	1,4940	1,4844	0,0157	$9,216 \times 10^{-5}$
						$\Sigma = 51,298 \cdot 10^{-5}$

Diperoleh persamaan regresi linear:  $y = -0,0156 + 0,0150x$

$r = 0,9998$

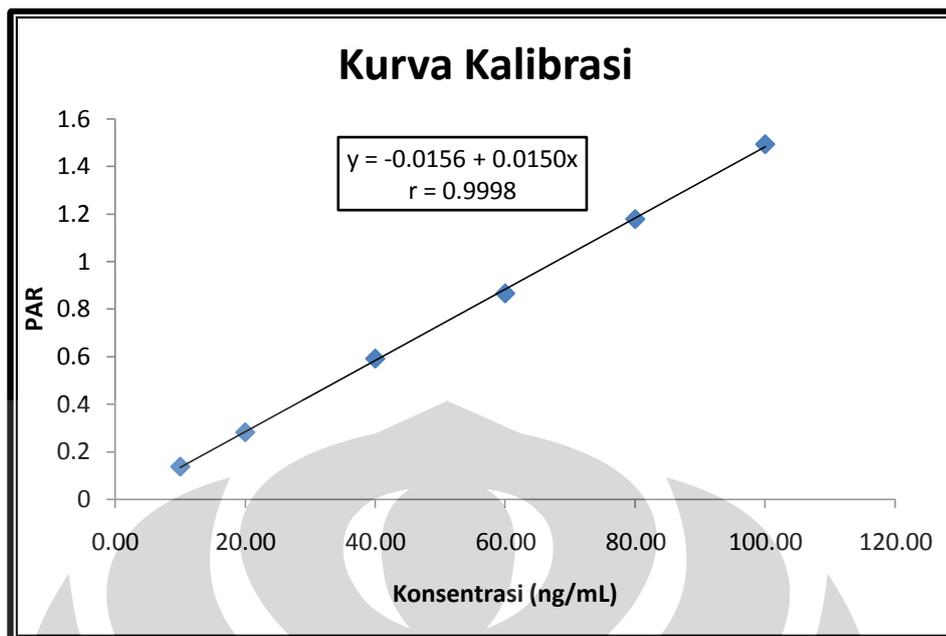
$X = 51,67$  ng/mL

$S_{x0} = 0,7533$

$V_{x0} = 1,46\%$

LOD = 2,26 ng/mL

LOQ = 7,53 ng/mL



Gambar 4.2. Kurva kalibrasi standar karbaril

Dari hasil pengujian diperoleh kurva kalibrasi yang memiliki persamaan regresi  $y = -0,0156 + 0,0150x$  dengan harga koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,9998. Hal ini menunjukkan bahwa pada rentang konsentrasi yang digunakan diperoleh suatu korelasi yang linear antara konsentrasi dengan perbandingan luas puncak (PAR) yang diperoleh. Dari kurva kalibrasi diperoleh nilai ( $V_{xo}$ ) lebih kecil dari 2,00% yaitu sebesar 1,46%. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pada konsentrasi yang digunakan diperoleh linearitas yang baik. Berdasarkan hasil perhitungan statistik diperoleh uji batas deteksi (LOD) karbaril yang relatif cukup rendah yaitu sebesar 2,26 ng/mL dan uji batas kuantitasi (LOQ) sebesar 7,53 ng/mL.

#### 4.6 Uji Kecermatan (Akurasi)

Pada uji akurasi karbaril digunakan tiga tingkat konsentrasi yaitu 100,00; 60,00 dan 20,00 ng/mL, memberikan hasil rata-rata uji perolehan kembali berturut-turut antara lain 99,30; 99,42 dan 99,46%. Semua data uji akurasi yang diperoleh memberikan hasil perolehan kembali yang memenuhi syarat yaitu berada dalam rentang  $100 \pm 2\%$ . Data hasil uji akurasi selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.3. Uji kecermatan (akurasi) karbaril

Konsentrasi (ng/mL)	PAR (y)	PAR Rata-rata ( $\bar{y}$ )	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	% diff	UPK (%)	Rata-rata UPK (%)
20	0,2826	0,2828	19,8800	19,8911	-0,6000	99,40	99,46
	0,2838		19,9600		-0,2000	99,80	
	0,2818		19,8267		-0,8665	99,13	
	0,2836		19,9467		-0,2665	99,75	
	0,2821		19,8467		-0,7665	99,25	
	0,2827		19,8867		-0,5665	99,45	
60	0,8787	0,8792	59,6200	59,6522	-0,6333	99,37	99,42
	0,8802		59,7200		-0,4667	99,53	
	0,8774		59,5333		-0,7778	99,22	
	0,8796		59,6800		-0,5333	99,47	
	0,8819		59,8333		-0,2778	99,72	
	0,8773		59,5267		-0,7888	99,22	
100	1,4712	1,4739	99,1200	99,3022	-0,8800	99,12	99,30
	1,4745		99,3400		-0,6600	99,34	
	1,4714		99,1333		-0,8667	99,13	
	1,4798		99,6933		-0,3067	99,69	
	1,4729		99,2333		-0,7667	99,23	
	1,4738		99,2933		-0,7067	99,29	

#### 4.7 Uji Keseksamaan (Presisi) Karbaril

Konsentrasi yang digunakan dalam uji presisi karbaril adalah 100,00; 60,00 dan 20,00 ng/mL, memberikan harga koefisien variasi berturut-turut 0,2103; 0,1820 dan 0,2829%. Berdasarkan hasil uji keterulangan (presisi) karbaril, semua data uji memberikan nilai koefisien variasi (KV) yang baik yaitu dibawah 2 %. Data hasil uji presisi karbaril selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.4. Uji keseksamaan (presisi) karbaril

Konsentrasi (x)	PAR (y)	PAR Rata-rata ( $\bar{y}$ )	SD	KV (%)
20	0,2826	0,2828	0,0008	0,2829
	0,2838			
	0,2818			
	0,2836			
	0,2821			
	0,2827			
60	0,8787	0,8792	0,0018	0,1820
	0,8802			
	0,8774			
	0,8796			
	0,8819			
	0,8773			
100	1,4712	1,4739	0,0031	0,2103
	1,4745			
	1,4714			
	1,4798			
	1,4729			
	1,4738			

#### 4.8 Uji Stabilitas

Uji stabilitas standar karbaril dengan konsentrasi sebesar 100,00 ng/mL pada hari ke nol memberikan nilai koefisien variasi (KV) sebesar 0,1848%; pada hari kedua belas sebesar 0,2138% dan pada hari ke dua puluh sembilan sebesar 0,6975%. Data hasil uji kestabilan karbaril adalah sebagai berikut:

Tabel 4.5. Uji stabilitas karbaril

Konsentrasi (ng/ml)	PAR		
	Hari ke 0	Hari ke 12	Hari ke 29
100	1,4071	1,4066	1,3770
	1,4091	1,4032	1,3666
	1,4040	1,4005	1,3857
$\bar{X}$	1,4067	1,4034	1,3764
SD	0,0026	0,0030	0,0096
% KV	0,1848	0,2138	0,6975

Dari data diatas terlihat adanya peningkatan dari nilai % KV, meskipun demikian nilai tersebut masih memenuhi syarat yaitu nilai  $KV \leq 2$ . Hal ini menunjukkan bahwa larutan standar bersifat relatif stabil.

#### 4.9 Orientasi SPE

Secara umum, baik sampel makanan maupun lingkungan tidak dapat dianalisis secara langsung tanpa persiapan sampel awal, karena kontaminan yang terkandung didalam matriks agak rumit. Persiapan sampel, seperti ekstraksi, konsentrasi, dan isolasi analit sangat berpengaruh terhadap kehandalan dan ketepatan suatu analisis (Pico et al, 2007).

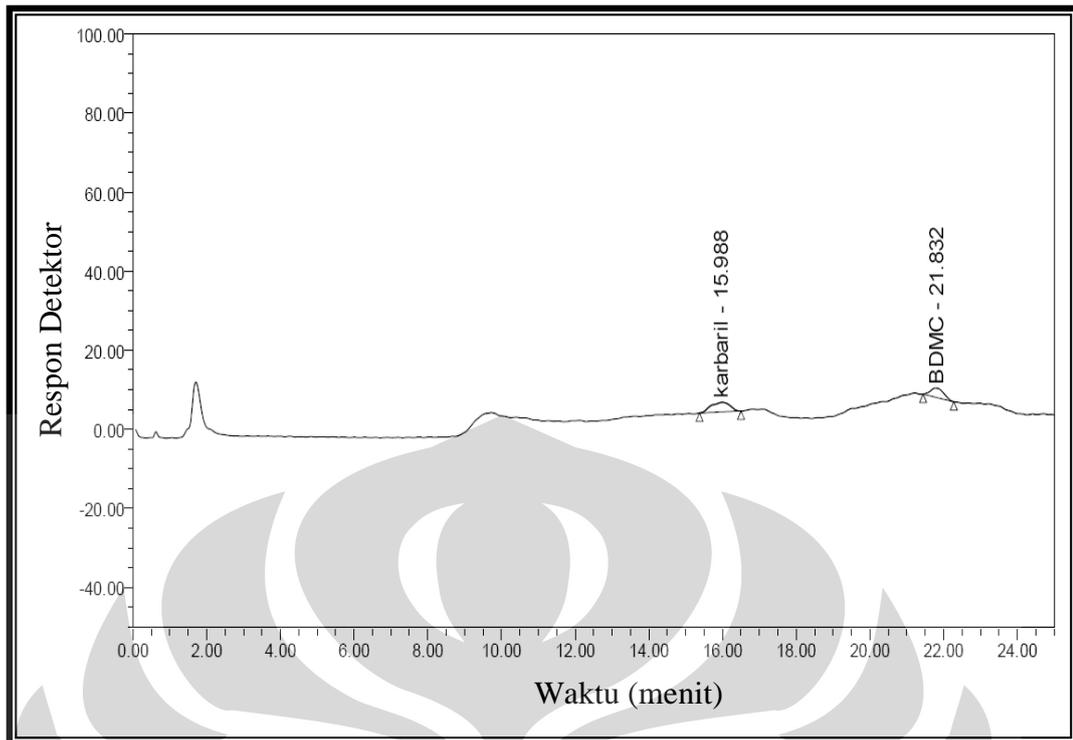
*Solid Phase Extraction* (SPE) adalah teknik yang paling penting yang digunakan dalam penyiapan sampel untuk KCKT. SPE merupakan proses

pemisahan analit dari gangguan-gangguan yang terdapat dalam fraksi analit, sangat efisien sehingga mudah untuk memperoleh hasil perolehan kembali yang tinggi dari analit (Snyder, Kirkland, & Glajch, 1997).

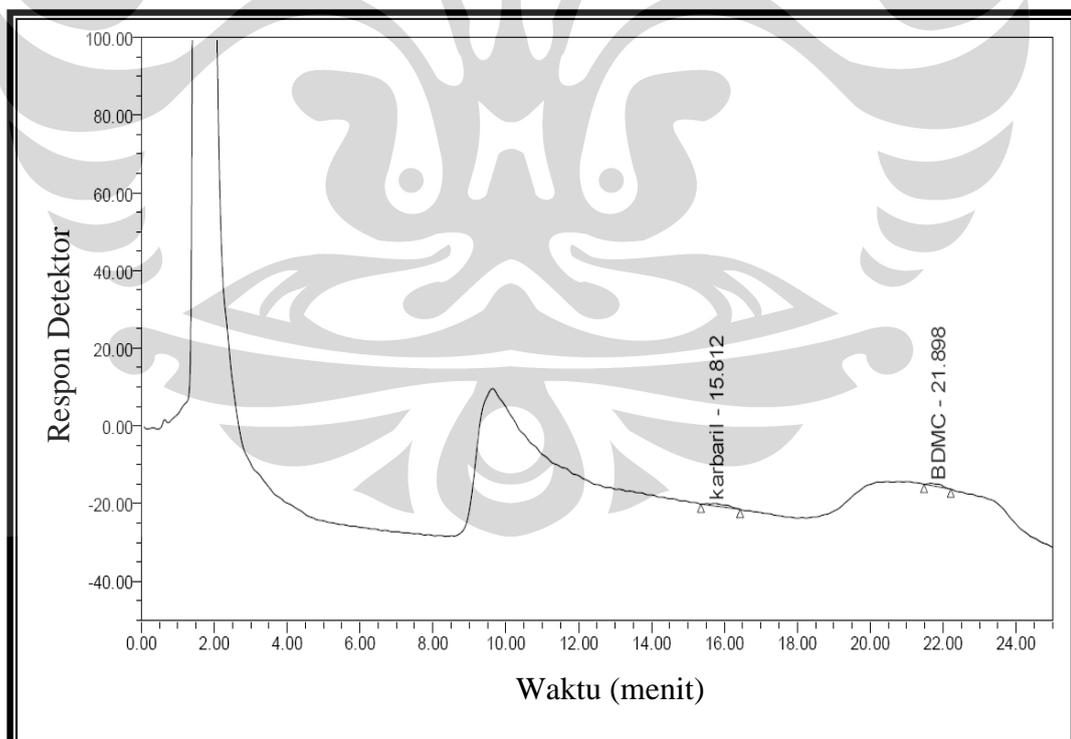
Pada penelitian ini, orientasi SPE dilakukan untuk proses ekstraksi sampel dengan menggunakan 2 macam SPE yaitu SPE C-18 dan SPE aminopropil untuk mengetahui SPE mana yang memberikan hasil yang lebih optimal dan efisien. Pada proses ekstraksi, filtrat sampel ditambah dengan larutan standar karbaril dan BDMC dengan konsentrasi 800 ng/mL, masing-masing sebanyak 250  $\mu$ L. Data dan gambar kromatogram hasil orientasi kedua SPE tersebut adalah sebagai berikut:

Tabel 4.6. Orientasi SPE

SPE	Konsentrasi (ng/ml)	PAR (y)	PAR Rata-rata ( $\bar{y}$ )	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	UPK (%)	Rata-rata UPK (%)
aminopropil	100	1,4742	1,4689	99,3200	98,9667	99,32	98,97
		1,4672		98,8533		98,85	
		1,4653		98,7267		98,73	
C-18	100	1,5729	1,5587	105,9000	104,9555	105,90	104,96
		1,5465		104,1400		104,14	
		1,5568		104,8267		104,83	



Gambar 4.3. Kromatogram campuran karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 100,9 ng/mL hasil uji SPE aminopropil



Gambar 4.4. Kromatogram campuran karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 109,0 ng/mL hasil uji SPE C-18

Dari tabel diatas diketahui bahwa sampel yang menggunakan SPE aminopropil telah memenuhi persyaratan yaitu memberikan nilai Uji Perolehan Kembali (UPK) yang berada dalam rentang  $100 \pm 2\%$ , yaitu sebesar 99,32; 98,85 dan 98,73%. Sedangkan sampel yang menggunakan SPE C-18 memberikan nilai UPK yang lebih dari 102%.

Selain itu, berdasarkan gambar kromatogram diatas terlihat bahwa respon dan peak yang diberikan pada SPE aminopropil lebih besar dibandingkan SPE C-18, sehingga dapat dikatakan bahwa SPE aminopropil memberikan hasil yang lebih optimal dan efisien daripada SPE C-18. Oleh karena itu, dalam penelitian ini SPE aminopropil menjadi SPE terpilih untuk proses ekstraksi sampel, meskipun respon yang diberikan masih kurang maksimal. Hal ini mungkin disebabkan karena proses pemurnian sampel dengan menggunakan SPE masih dilakukan secara manual karena keterbatasan alat penelitian, yaitu dengan teknik gaya gravitasi, sehingga laju alir dari larutan yang keluar melalui SPE hanya 1 mL/menit. Jika menggunakan vakum manifold dalam penggunaan SPE aminopropil untuk proses pemurnian kemungkinan hasil yang diperoleh bisa lebih baik. Dari kromatogram tersebut terlihat bahwa peak karbaril dan BDMC mengalami pelebaran. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya sebagian analit yang terurai dan berubah bentuk pada saat proses penguapan.

#### **4.10 Uji Kecermatan (Akurasi) dari Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah tomat merah karena tomat merah banyak dikonsumsi oleh masyarakat. Tahap awal pada perlakuan sampel yaitu dilakukan penghalusan sampel bersama asetonitril dengan menggunakan blender, kemudian ekstrak disaring dengan corong yang dilapisi kertas saring.

Selanjutnya, filtrat dimasukkan kedalam corong pisah, ditambahkan sejumlah NaCl, lalu dikocok kuat beberapa menit dan diamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Telah lama diketahui bahwa penambahan garam anorganik ke dalam campuran air dan pelarut organik tidak bercampur dengan air (*water-miscible solvents*) menyebabkan terjadinya pemisahan kedua campuran pelarut tersebut

menjadi pembentukan sistem dua fasa. Kadang-kadang fenomena ini disebut sebagai "pemisahan fase diinduksi garam" (Majors, 2009). Penambahan garam natrium klorida ini bertujuan untuk meningkatkan kelarutan protein. Molekul garam akan menstabilkan molekul protein dengan menurunkan energi elektrostatik diantara molekul protein sehingga kelarutan protein akan meningkat (*salting in*). Pada suatu saat, seiring dengan peningkatan konsentrasi garam maka kelarutan protein akan menurun karena molekul garam akan bersaing dengan molekul protein untuk mengikat air sehingga akan terjadi pemisahan antara cairan minyak dengan air (*salting-out*) Jenis dan konsentrasi garam yang berbeda akan menyebabkan perbedaan derajat pemisahan fasa. Ekstraksi menggunakan efek *salting-out* mulai digunakan lebih luas di bidang analisis pestisida. Penggunaan asetonitril diikuti oleh penggaraman terbukti lebih cocok untuk ekstraksi baik pestisida polar maupun nonpolar dari sampel sayuran dan saat ini telah diadopsi oleh beberapa badan pengawas. Namun, ekstrak yang dihasilkan masih terlihat sedikit kotor. Dalam penelitian ini, lapisan yang diambil untuk proses pemurnian adalah lapisan atas (lapisan asetonitril). Pada lapisan bawah mengandung komponen utama yang sering mengganggu seperti lemak, protein dan sebagainya yang dapat dipisahkan dari analit (Alshehri; Majors, 2009). Gambar hasil ekstraksi sampel tomat merah setelah penambahan garam NaCl dapat dilihat pada lampiran 14.

Berdasarkan kromatogram yang dihasilkan terlihat bahwa peak karbaril dan BDMC mengalami pelebaran sehingga area standar karbaril dan BDMC dari sampel terdeteksi sangat rendah, meskipun telah mengalami proses pencucian sebanyak sepuluh kali dengan 2 mL metanol-diklormetan (1:99). Selain itu kemungkinan juga karena adanya sebagian analit yang mengalami perubahan bentuk pada saat proses penguapan, sehingga analit terdeteksi dalam bentuk yang agak berbeda jika dibandingkan dengan standar.

Menurut Nunes et al (1998), pengaruh suhu berpengaruh sangat kuat terhadap stabilitas karbaril. Hal ini juga dijelaskan dalam karya-karya lain yang mengatakan bahwa karbaril memiliki stabilitas yang rendah pada temperatur yang lebih tinggi dari 40-45°C. Oleh karena itu, selama proses penguapan kerugian

besar dapat terjadi pada suhu yang lebih tinggi dari 35°C. Hilangnya perolehan kembali yang besar dapat disebabkan oleh pengaruh suhu dan lamanya proses penguapan ekstrak. Selain itu kemungkinan juga bisa disebabkan karena karbaril dan BDMC masih banyak yang tertahan dalam SPE aminopropil karena proses pemurniannya masih secara manual. Jika menggunakan alat khusus yaitu vakum manifold kemungkinan kadar yang diperoleh akan lebih besar. Meskipun demikian, semua data uji akurasi yang diperoleh memberikan hasil perolehan kembali yang berada dalam rentang  $100 \pm 2\%$ . Konsentrasi yang digunakan untuk uji akurasi karbaril dalam sampel adalah 100,00; 60,00 dan 40,00 ng/mL dengan hasil rata-rata uji perolehan kembali berturut-turut sebesar 98,96; 99,21 dan 99,14%. Data uji akurasi karbaril dalam sampel adalah sebagai berikut:

Tabel 4.7. Uji kecermatan (akurasi) karbaril dalam sampel

Konsentrasi (ng/mL)	PAR (y)	PAR Rata-rata ( $\bar{y}$ )	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	% diff	UPK (%)	Rata-rata UPK (%)
40	0,5791	0,5792	39,6467	39,6567	-0,0088	99,12	99,14
	0,5808		39,7600		-0,0060	99,40	
	0,5768		39,4933		-0,0127	98,73	
	0,5779		39,5667		-0,0108	98,92	
	0,5802		39,7200		-0,0070	99,30	
	0,5807		39,7533		-0,0062	99,38	
	60		0,8760		0,8772	59,4400	
0,8742		59,3200	-0,0113	98,87			
0,8771		59,5133	-0,0081	99,19			
0,8859		60,1000	0,0017	100,17			
0,8740		59,3067	-0,0115	98,84			
0,8763		59,4600	-0,0090	99,10			
100		1,4742	1,4687	99,3200		98,9567	-0,0068
	1,4672	98,8533		-0,0015	98,85		
	1,4653	98,7267		-0,0127	98,73		
	1,4645	98,6733		-0,0133	98,67		
	1,4698	99,0267		-0,0097	99,03		
	1,4715	99,1400		-0,0086	99,14		

#### 4.9 Uji Keseksamaan (Presisi) dari Sampel

Uji keterulangan (presisi) karbaril dalam sampel menggunakan konsentrasi 100,00; 60,00 dan 40,00 ng/mL memberikan harga koefisien variasi (KV) berturut-turut 0,2587; 0,5016 dan 0,2762%. Semua data uji presisi yang diperoleh memberikan nilai koefisien variasi dibawah 2%. Data hasil uji presisi selengkapnya adalah sebagai berikut:

Tabel 4.8. Uji keseksamaan (presisi) karbaril dalam sampel

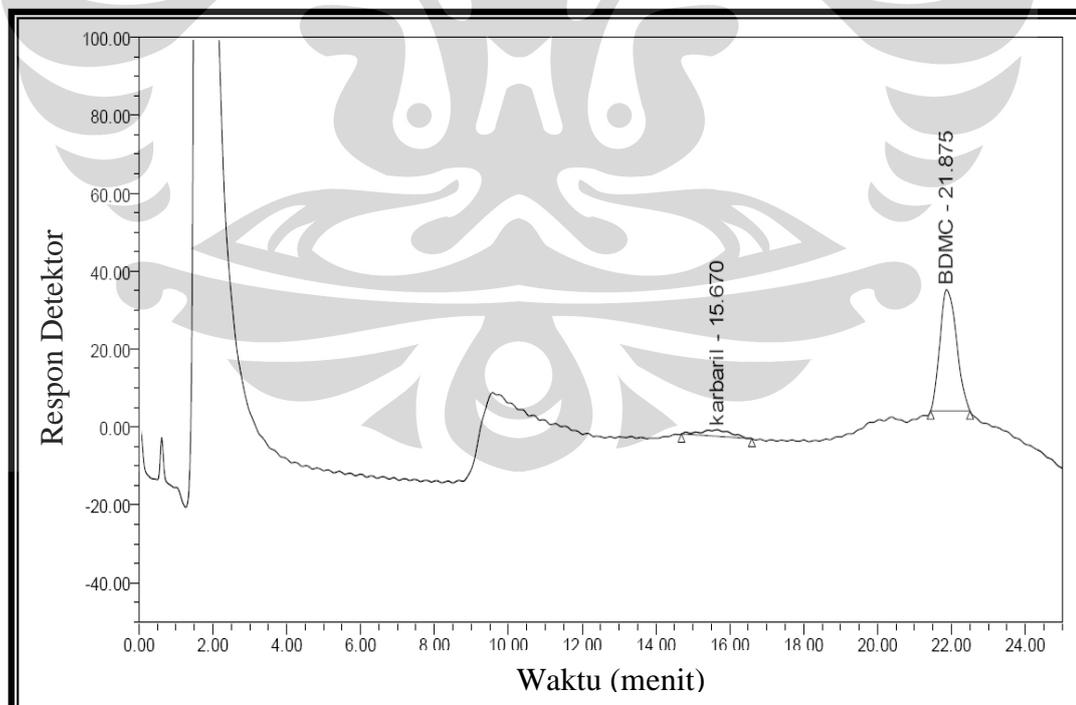
Konsentrasi (x)	PAR (y)	PAR Rata-rata ( $\bar{y}$ )	SD	KV (%)
40	0,5791	0,5792	0,0016	0,2762
	0,5808			
	0,5768			
	0,5779			
	0,5802			
	0,5807			
60	0,8760	0,8772	0,0044	0,5016
	0,8742			
	0,8771			
	0,8859			
	0,8740			
	0,8763			
100	1,4742	1,4687	0,0038	0,2587
	1,4672			
	1,4653			
	1,4645			
	1,4698			
	1,4715			

#### 4.10 Uji Perolehan Kembali dari Sampel Simulasi

Pada penelitian ini dibuat sampel simulasi dengan penambahan internal standar yaitu BDMC pada saat rekonstitusi terakhir sebelum penginjeksian kedalam alat KCKT. Hal ini bertujuan untuk mengetahui efisiensi metode ekstraksi sampel yang digunakan. Standar internal ini digunakan sebagai faktor koreksi dari proses ekstraksi yang dilakukan. Data dan gambar hasil uji perolehan kembali dari sampel simulasi adalah sebagai berikut:

Tabel 4.9. Hasil pengukuran uji perolehan kembali dari sampel simulasi

Konsentrasi (ng/mL)	PAR (y)	PAR Rata-rata ( $\bar{y}$ )	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi Terukur Rata-rata (ng/mL)	UPK (%)	UPK Rata-rata (%)
100	0,1088	0,1086	8,2933	8,2778	8,29	8,28
	0,1083		8,2600		8,26	
	0,1086		8,2800		8,28	



Gambar 4.5. Kromatogram campuran karbaril 100,0 ng/mL dan BDMC 100,9 ng/mL hasil ekstraksi sampel simulasi tomat merah organik

Berdasarkan data diatas terlihat adanya perbedaan yang sangat besar antara peak karbaril dan peak BDMC yang ditambahkan pada rekonstitusi akhir. Perbedaan juga dapat dilihat dari bentuk peak BDMC yang ditambahkan pada rekonstitusi akhir terlihat lebih baik, tidak mengalami pelebaran dan area yang didapat lebih besar jika dibandingkan dengan peak BDMC yang mengalami proses penguapan pada uji akurasi dan presisi sampel. Besarnya penyimpangan perolehan kembali ini mungkin disebabkan proses ekstraksi yang masih kurang sempurna. Dari hasil pengujian diketahui bahwa persentase perolehan kembali dari karbaril setelah mengalami proses ekstraksi dari sampel buah simulasi sangat rendah yaitu sebesar 8,28%. Persentase perolehan kembali yang baik berada dalam rentang  $100 \pm 2\%$ . Menurut Nunes et al (1998), hilangnya perolehan kembali yang besar dapat disebabkan oleh pengaruh suhu dan lamanya proses penguapan ekstrak. Selain itu kemungkinan juga bisa disebabkan karena karbaril dan BDMC masih banyak yang tertahan dalam SPE aminopropil karena proses pemurniannya masih secara manual yaitu hanya mengandalkan gaya gravitasi. Jika menggunakan alat khusus yaitu vakum manifold kemungkinan kadar yang diperoleh akan lebih besar sehingga persentase perolehan kembalinya juga lebih besar.

## **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1. KESIMPULAN**

1. Analisis pestisida karbaril dapat dilakukan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pasca kolom menggunakan kolom dimetiloktadesilsilil (*Waters Carbamate Column* 3,9 x 150 mm) dengan komposisi fase gerak gradien yaitu air-metanol-asetonitril, laju alir 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, suhu reaktor pasca kolom 80°C, laju alir reagen pasca kolom masing-masing 0,5 mL/menit dan dideteksi dengan detector fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 339 nm dan emisi 445 nm.
2. Persentase perolehan kembali dari cara ekstraksi sampel yang digunakan adalah sebesar 8,28%

### **5.2. SARAN**

1. Metode ini dapat digunakan untuk analisis pestisida derivat N-metilkarbamat, sehingga perlu dikembangkan untuk analisis pestisida golongan N-metilkarbamat lainnya,
2. Perlu dikembangkan metode ekstraksi sampel dengan menggunakan SPE aminopropil yang lebih baik yaitu menggunakan alat khusus vakum manifold karena kromatogram hasil ekstraksi sampel pada penelitian ini memberikan hasil yang kurang baik dan perolehan kembalinya masih kurang maksimal.
3. Pada proses penguapan ekstrak sebaiknya menggunakan suhu yang lebih rendah dari 35°C karena stabilitas karbaril sangat rendah pada suhu lebih dari 35°C.

## DAFTAR ACUAN

- Abad, A., Moreno, M.J., Pelegri, R., Martinez, M.I., Saez, A., Gamon, M., Montoya, G. (1999). Determination of Carbaryl, Carbofuran and Methiocarb in Cucumbers and Strawberries by Monoclonal Enzyme Immunoassays and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection An Analytical Comparison. *Journal of Chromatography A*, 833: 3–12
- Alshehri, T. *Salting in, Salting out and Dialysis of Proteins*. King Saudi University.  
<http://faculty.ksu.edu.sa/noa/Documents/salting%20in,salting%20out%20and%20dialysis.doc>. 08 Juni 2010.
- Connell, D.W., & Gregory, J.M. (1995). *Kimia dan Ekotoksikologi Pencemaran*. (Koestoer, Y. Penerjemah.). Jakarta: Universitas Indonesia: 237-238.
- Djojosumarto, P. (2008). *Pestisida dan Aplikasinya*. Jakarta: Agromedia Pustaka: 97-99.
- Food and Agriculture Organization. (Maret 2007). *Specification and Evaluations for Agricultural Pesticides*.  
<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/Carbaryl07.pdf>. 6 januari 2010.
- Gandjar, I.G., & Abdul, R. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar: 401-406.

Gupta, R.C. (2006). *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Elsevier Academic Press.USA: 17.

Handoko, T., & Sukarno. (1979). *Pestisida, Keracunan Akut dan Penanggulangannya*. Cermin dunia kedokteran. No. 15: 35-37

Harmita (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi. FMIPA. Universitas Indonesia:101-126; 143.

Indrawati, D.T. (2009). *Validasi Metode Analisis Residu Pestisida Karbofuran Dalam Sayur sayuran Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pasca Kolom*. Depok: Departemen Farmasi. Universitas Indonesia.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1994). *Carbaryl. Environmental Health Criteria*. No.153. World Health Organization (WHO). Geneva:13-25.

International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1992). *Carbaryl. Health and Safety Guide*. No. 78. World Health Organization (WHO). Geneva. [http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg78\\_e.htm](http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg78_e.htm). 06 januari 2010.

Johnson, E.L., & Robert, S. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. ( Padmawinata K, Penerjemah.). Bandung: ITB: 105

Komisi Pestisida. (1997). *Metode Pengujian Pestisida dalam Hasil pertanian*. Departemen Pertanian. Bogor: 246-259.

LCTech. (November 2009). *Carbamates*. Dorfen, German. [www.LCTech.de](http://www.LCTech.de).

24 Januari 2010.

Majors, R.E., (2009). *Salting-out Liquid-Liquid Extraction (SALLE)*.

<http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=613590>.

08 Juni 2010.

Massey, K.A., Engelen, D.L.V., & Warner, I.M. (1995). Determination of Carbaryl as Its Primary Metabolite, 1-naphthol, By Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Talanta* 42: 1457-1463

Nöllet, L.M.L. (1992). *Food Analysis By HPLC*. New York: Marcel Dekker.

Nunes, G.S., Ribeiro, M.L., Polese, L., & Barcelo, D. (1998). Comparison of Different Clean-up Procedures for the Determination of N-Methylcarbamate Insecticides in Vegetable Matrices by High Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Journal of Chromatography A*, 795: 43–51.

Pico, Y., Fernandez, M., Ruiz, M.J., & Font, G. (2007). Review Current Trends in Solid Phase-Based Extraction Techniques for the Determination of Pesticides in Food and Environment. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 : 117–131

Santalad, A., Srijaranai, S., Burakham, R., Sakai, T., & Deming, R.L. (2008). Acid-Induced Cloud-Point Extraction Coupled to Spectrophotometry for the Determination of Carbaryl Residues in Waters and Vegetables. *Microchemical Journal*. 90: 50–55

Sigma Aldrich. (2010).

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=346942|ALDRICH&N5=SEARCH CONCAT PNO|BRAND KEY&F=SPE>  
C. 23 Juni 2010.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Glajch, J.L. (1997). *Practical HPLC Method Development*. (Ed. Ke-2). New York: John Wiley & Sons: 119-120, 163-165.

Sudarmo,S. (1988). *Pestisida Tanaman*. Yogyakarta: Kanisius: 30.

Tarumingkeng, R.C. (1992). *Insektisida. Sifat, Mekanisme Kerja, dan Dampak Penggunaannya*. Jakarta: UKRIDA. 6; 74-75; 146-147.

The United State Pharmacopoeia XXX (2007): 621; 1225.

VG MassLab. (1992). *Applications. Analysis of Carbamate and Phenylurea Pesticides Using the MD800 LCD HPLC-MS System*. United Kingdom.  
<http://www.vgmasslab.co.uk>. 01 januari 2010.

Waters Corporation. (2003). *Waters Alliance System for Carbamate Analysis*. USA: 15-64

Waters Corporation (1999). *Waters Post-Column Reaction Module*. USA: 1.1-1.3.

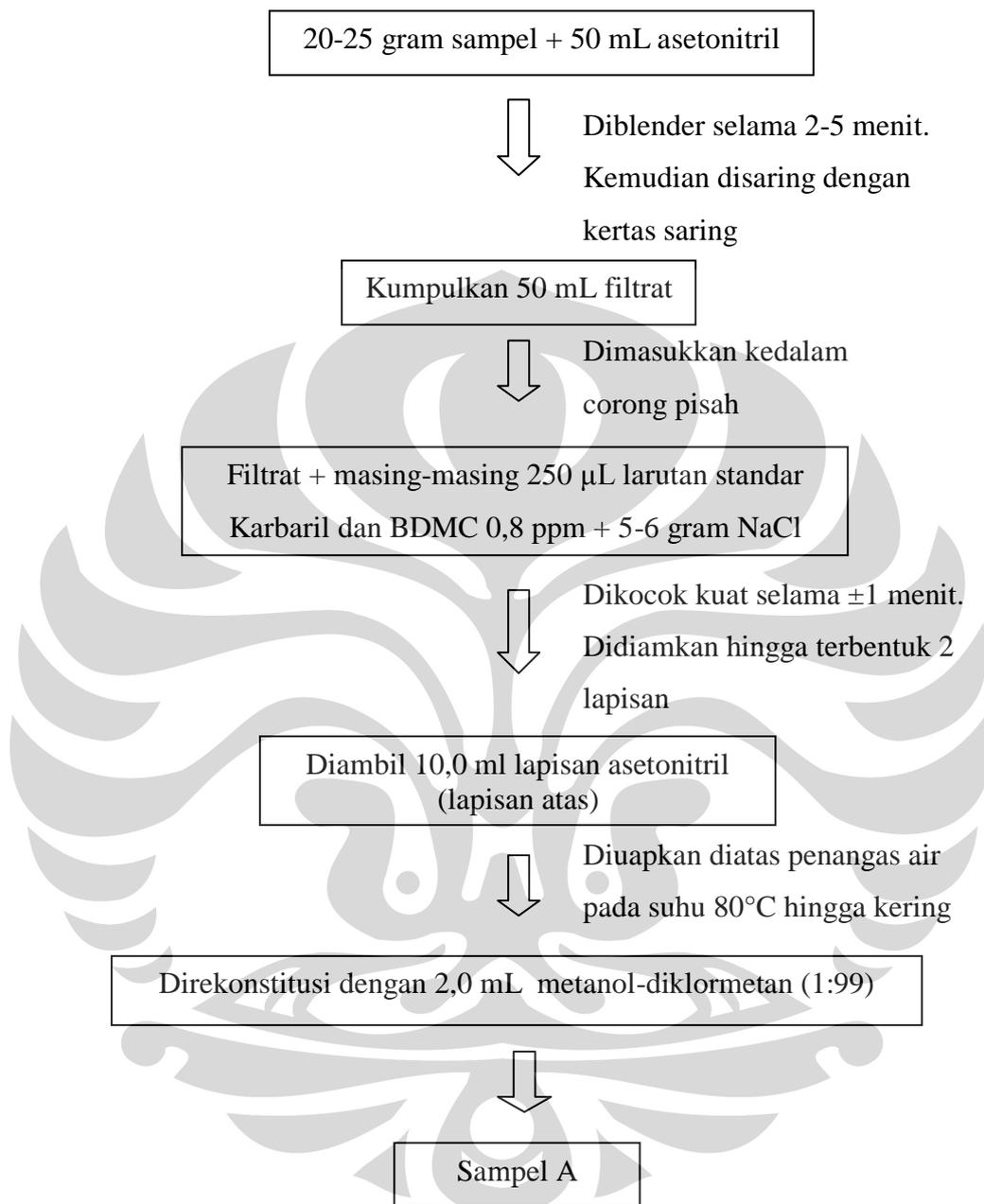
Waters Corporation. (2008). *Food Safety Application Notebook*. USA. 14.

Wudianto, R. (2006). *Petunjuk Penggunaan Pestisida. Edisi Revisi*. Jakarta: Penebar Swadaya: 5.

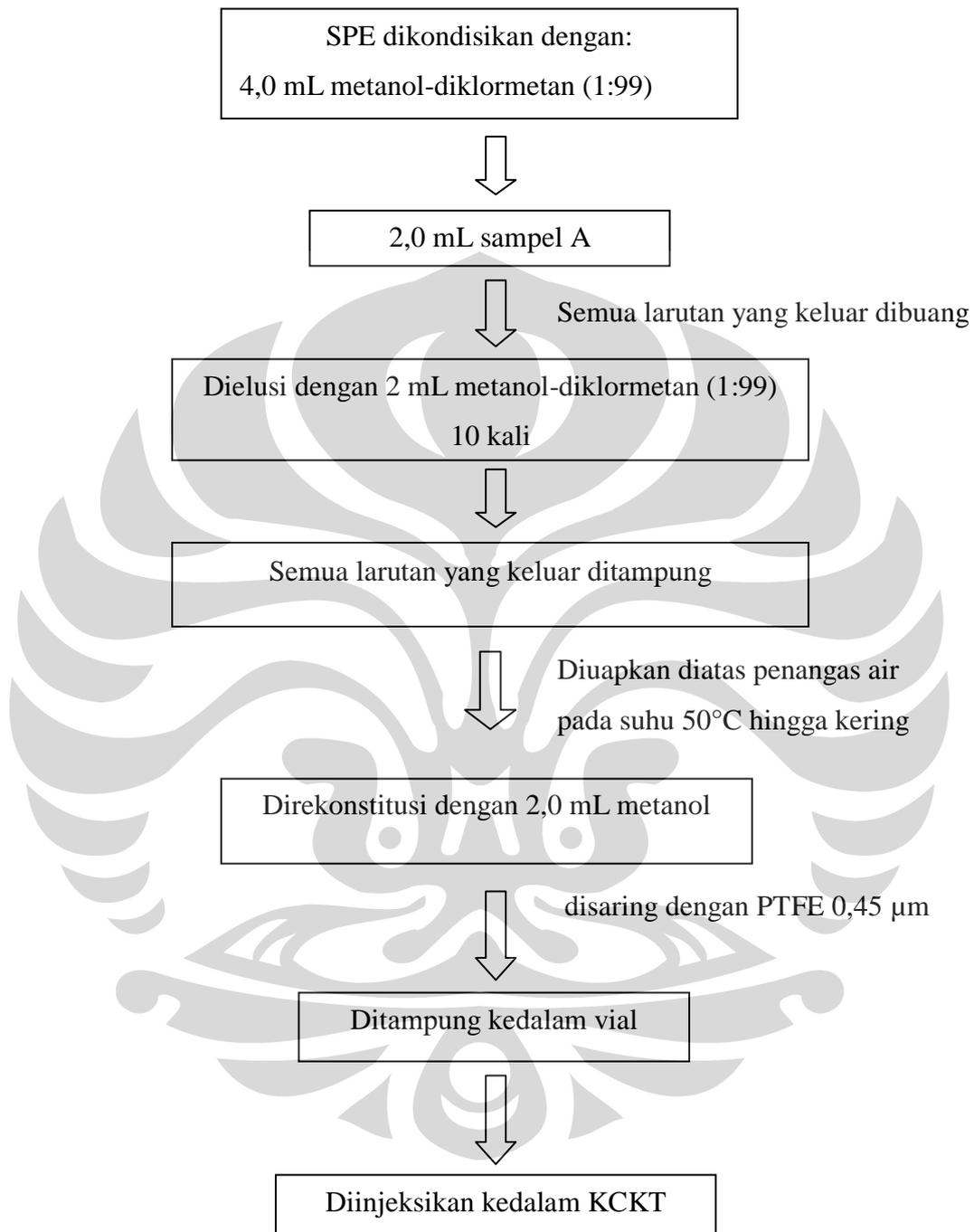
**Universitas Indonesia**



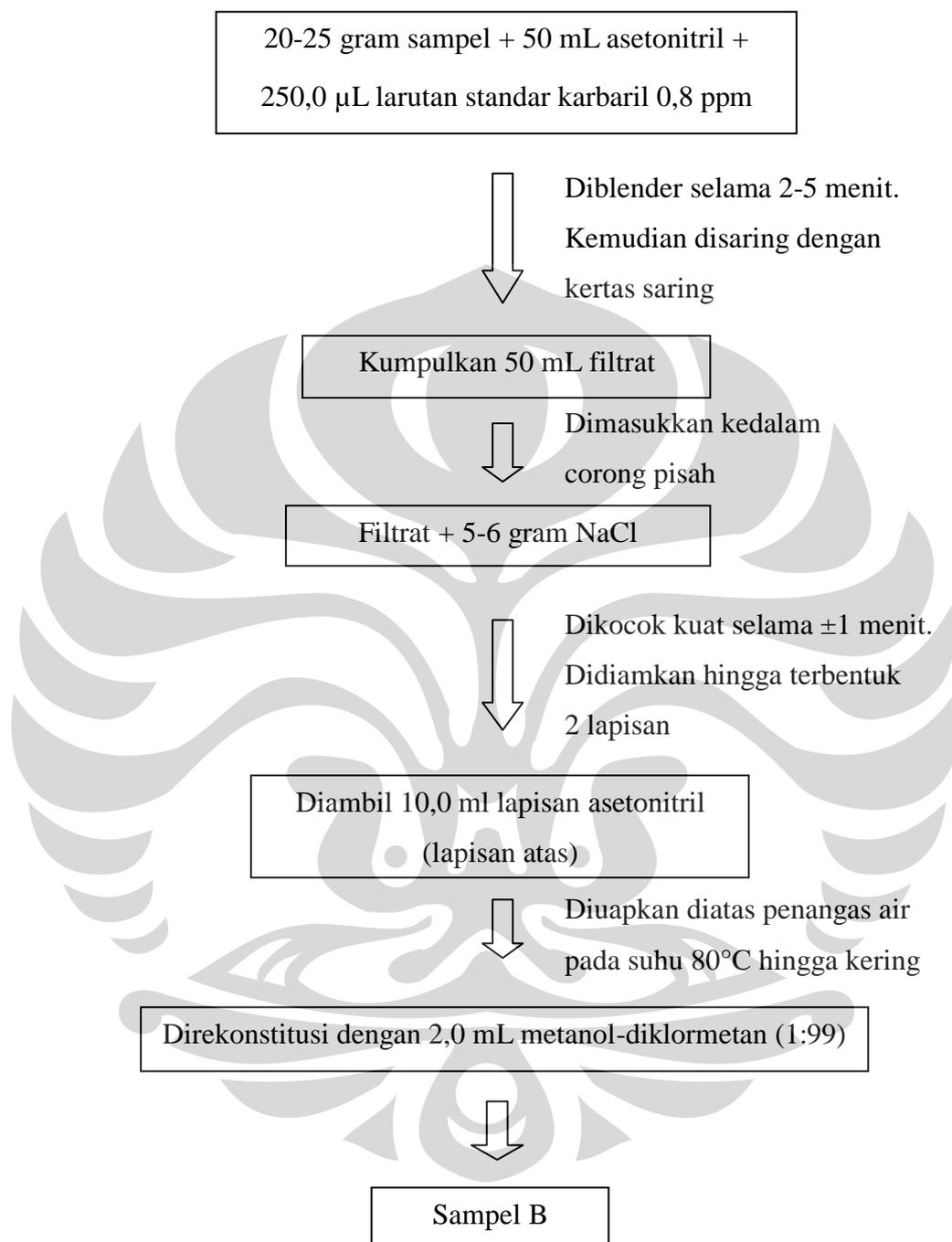
## Lampiran 1. Skema ekstraksi sampel simulasi



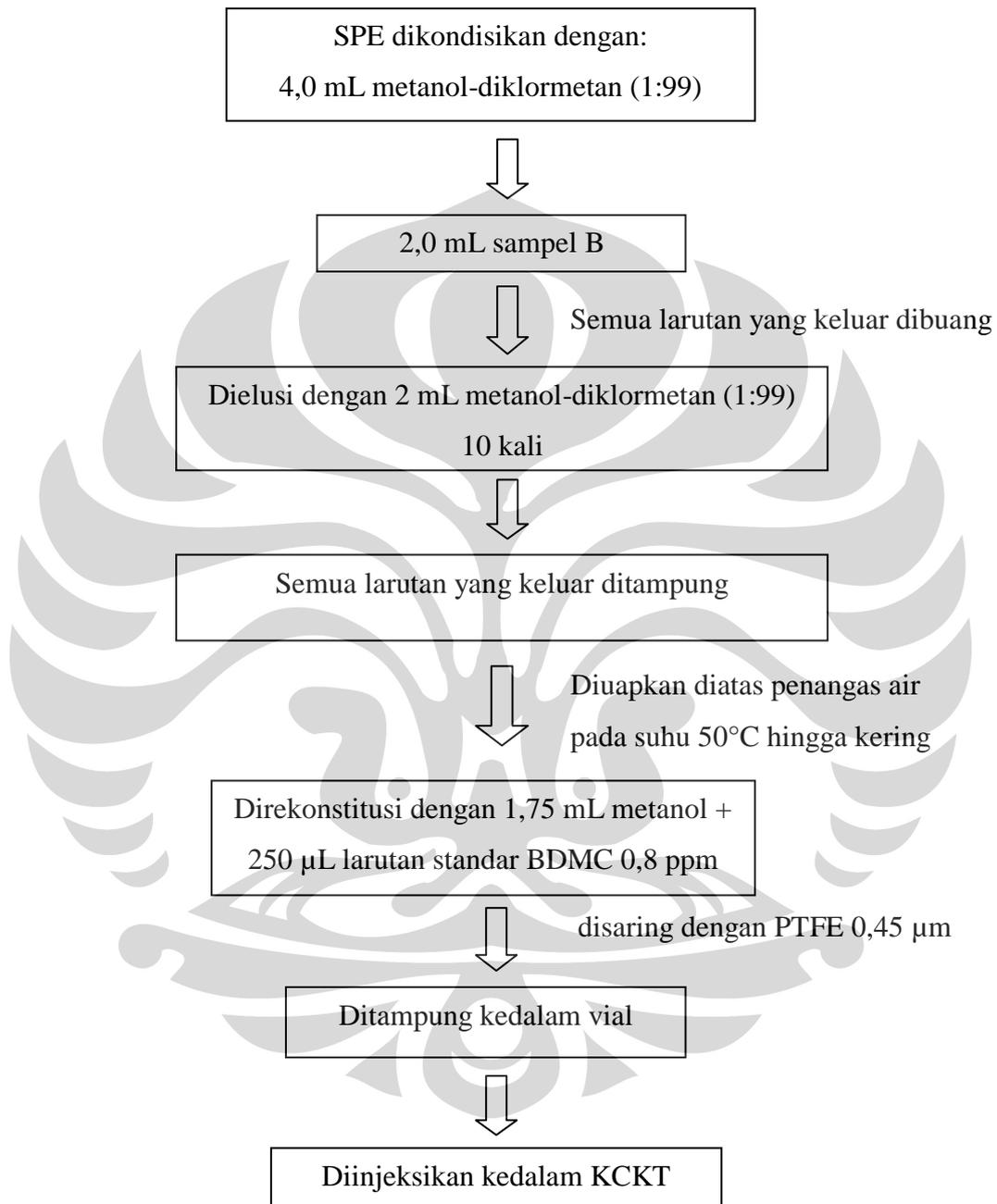
## Lampiran 2. Skema pemurnian sampel dengan SPE



Lampiran 3. Skema ekstraksi untuk perolehan kembali dari sampel simulasi



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



## Lampiran 5. Cara perhitungan efisiensi kolom

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

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

Keterangan:

N = jumlah pelat teoritis

HETP = panjang lempeng teoritik

$t_R$  = waktu retensi

W = lebar puncak

L = panjang kolom



## Lampiran 6. Cara perhitungan resolusi (R)

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

Keterangan:

R = resolusi

$t_{RB}$  = waktu retensi spesi B

$t_{RA}$  = waktu retensi spesi A

$W_B$  = lebar puncak spesi B, yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar

$W_A$  = lebar puncak spesi A, yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar

Lampiran 7. Cara perhitungan faktor ikutan ( $T_f$ )

Faktor ikutan dihitung dengan rumus:

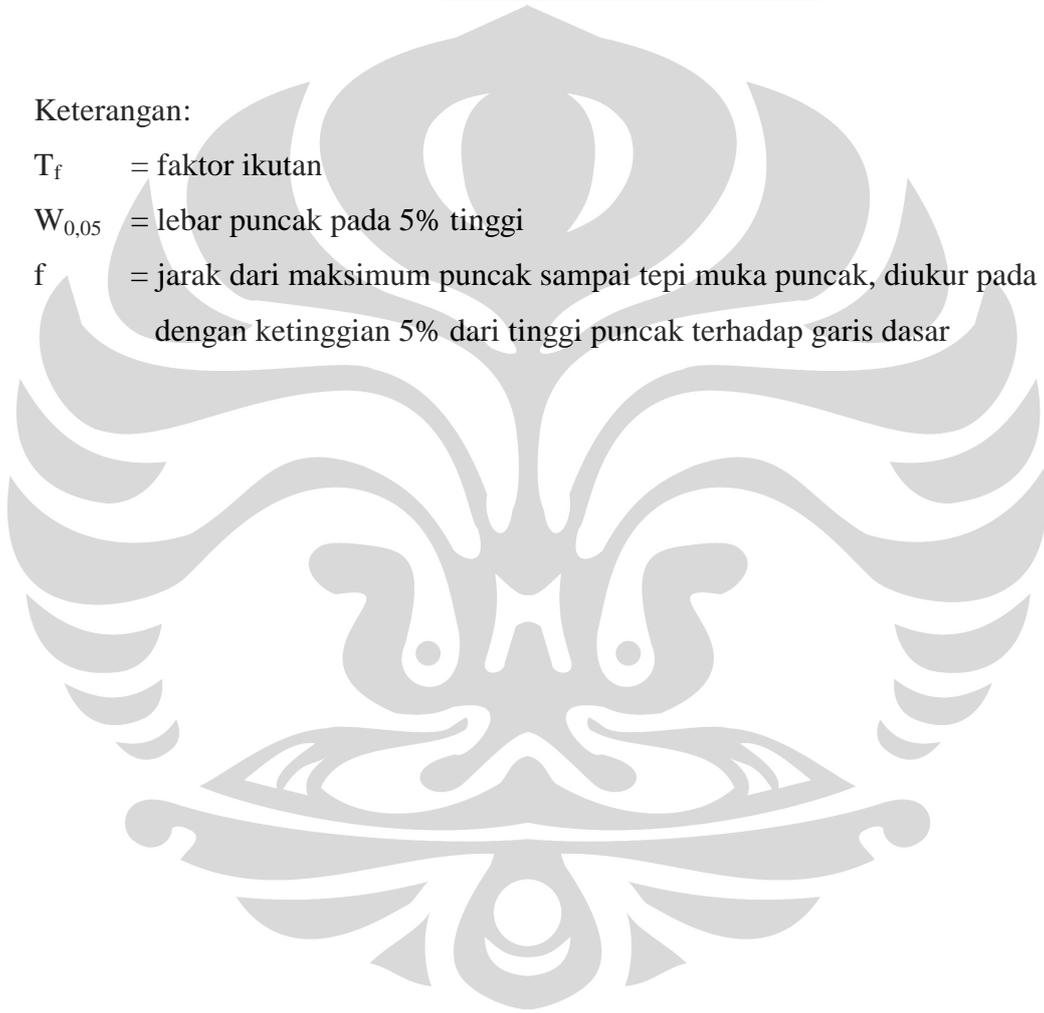
$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

Keterangan:

$T_f$  = 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 tinggi puncak terhadap garis dasar



## Lampiran 8. Cara perhitungan persamaan garis linear (linearitas)

Dari kurva kalibrasi diperoleh persamaan :

$$y = a + bx$$

r = koefisien korelasi

a dan b dihitung dengan rumus :

a = *intercept*

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

b = *slope*

$$b = \frac{N(\sum x_i y_i) - (\sum x_i)(\sum y_i)}{(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

r = koefisien korelasi

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2][N(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

## Lampiran 9. Cara perhitungan perolehan kembali (akurasi)

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

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

Keterangan:

$\hat{x}$  = konsentrasi terukur

$x$  = konsentrasi sebenarnya



## Lampiran 10. Cara perhitungan simpangan baku (SD)

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

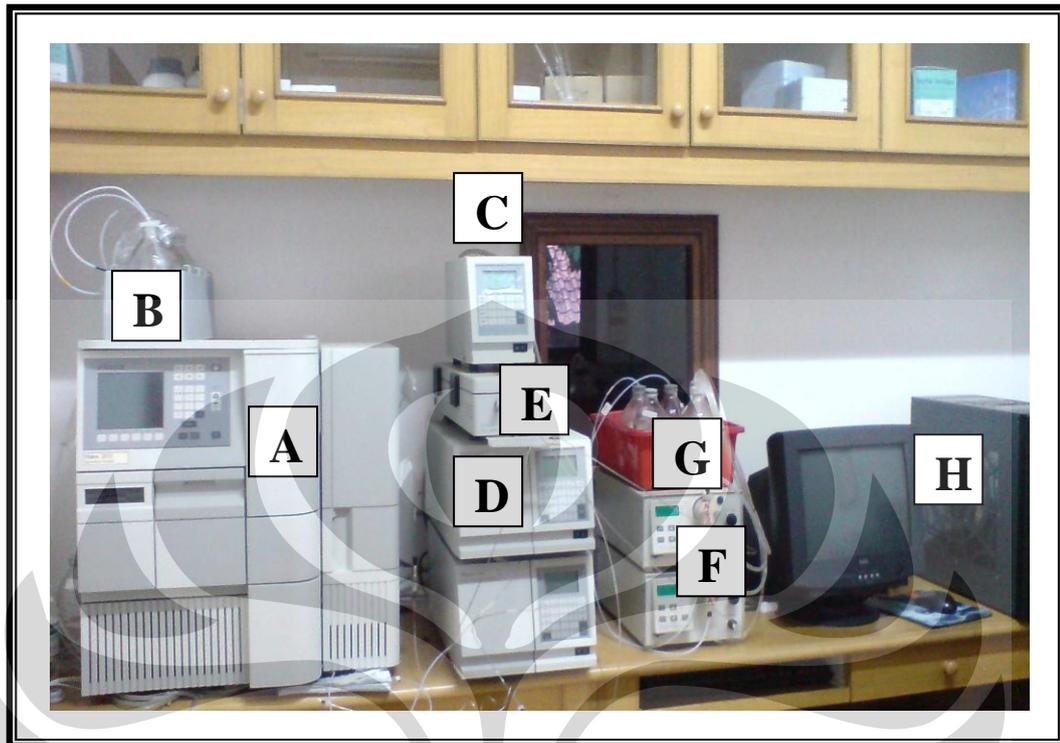
Keterangan :

$\bar{x}$  = perbandingan luas puncak (PAR) rata-rata

n = jumlah replika penyuntikan



## Lampiran 11. Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pasca Kolom



Keterangan :

- A. Pemisah kromatografi (*Waters 2695 Separation Module*)
- B. Reservoir fase gerak
- C. Pengatur suhu pasca kolom (*Waters Temperature Control Module*)
- D. Detektor fluoresensi (*Waters 2475 Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector*)
- E. Reaktor pasca kolom (*Waters Post Column Reaction Module*)
- F. Pompa reagen pasca kolom (*Waters Reagen Manager*)
- G. Reagen pasca kolom
- H. Sistem pengatur (*Empower Software*)

## Lampiran 12. Sampel tomat merah organik



Lampiran 13. Filtrat sampel tomat merah organik



Lampiran 14. Hasil ekstraksi sampel tomat merah organik setelah penambahan garam NaCl



## Lampiran 15. Proses pemurnian sampel dengan SPE aminopropil



## Lampiran 16. Sertifikat analisis standar karbaril

125 Market Street New Haven, CT 06513 US		 <b>AccuStandard, Inc.</b>		Tel (203) 786-5290 Fax (203) 786-5287 Web www.accustandard.com	
<b>CERTIFICATE OF ANALYSIS</b>					
<b>CATALOG NO:</b> P-083S		<b>DATE CERTIFIED:</b> Sep 22, 2009			
<b>DESCRIPTION:</b> Carbaryl		<b>EXPIRATION:</b> Sep 22, 2011			
<b>LOT:</b> 209091200		<b>SAMPLE SIZE:</b> 1 mL			
<b>SOLVENT:</b> Methanol		<b>STORAGE CONDITION:</b> Freeze (<10° C)			
		<b>HAZARDS:</b> FLAMMABLE			

Component	CAS No.	Purity % (HPLC)	Prepared Concentration <sup>1</sup> (µg/mL)	Certified Analyte Concentration <sup>2</sup> (µg/mL)
Carbaryl	63-25-2	99.0	100.0	99.0

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 (ucy). 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 Uc(y) \* 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-ORGIN-001  
Rev. 05/05

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

## Lampiran 17. Sertifikat analisis baku dalam BDMC

**ChemService**

55C Tresser Lane • P.O. Box 599 • West Chester, PA 19381-0599  
1-800-452-0994 • 1-610-696-9066 • Fax 1-610-692-1729  
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

