

ANALISIS PESTISIDA KARBARIL DENGAN METODE KLT- DENSITOMETRI DALAM MATRIKS KEDELAI DAN VALIDASI METODENYA

Sugijanto^{a*}, Prihatin^b, Noor Erma Sugijanto N^a

^aFakultas Farmasi Universitas Airlangga,

^bBadan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia

*alamat email: ermasugijanto@yahoo.co.id

ABSTRACT

A simple and rapid densitometric method has been developed for determination of low levels of carbaryl in soy bean matrix samples. Sample carbaryl in the soybean matrix was extracted with acetonitril, chloroform and NaCl 0.2 % solution, and the resulting chloroform layer was separated, added sodium sulphate anhydrous to get free of water than evaporated. After dissolution in methanol, the solutions were spotted on silica gel GF₂₅₄ plates which were then eluted with toluene: ethyl acetate = 3:1 (v/v). Quantitative evaluation was performed by measuring the absorbance reflectance of the analyte spots at λ 280 nm. This densitometric method is selective, precise, accurate and can be used for the determination carbaryl in soy bean matrix.

Key words: carbaryl, TLC-densitometry, validation metode, soy bean

PENGANTAR

Penggunaan pestisida dapat mencegah dan membasmi hama secara efektif dan efisien, namun bila tidak tepat cara pemberian maupun dosisnya dapat menimbulkan dampak merugikan. Karbaril, nama kimianya 1-naftil metilkarbamat merupakan pestisida yang masih dipakai dalam bidang pertanian di beberapa negara termasuk Indonesia dengan nama dagang Sevin, Sekvul atau Carbacide namun di United Kingdom, Austria, Denmark, Swedia, Jerman, dan Angola sudah dilarang penggunaannya. Karbaril suatu kolinesterase inhibitor yang toksik untuk manusia, dan digolongkan karsinogen oleh *United States Environmental Protection Agency (EPA)* (Anonymus, 2003). WHO dan FAO menetapkan ketentuan tentang batas maksimum residu pestisida pada tiap jenis makanan dan hasil pertanian dan seberapa banyak residu pestisida yang masih dapat diterima perhari (*Acceptable daily intake*), untuk karbaril 0,001mg/kg berat badan (Anonymus, 1986). Dalam hal mengurangi bahaya keracunan pestisida ini perlu dipantau kadar residu karbaril di bahan makanan secara berkala. Mengkaji apakah ketentuan-ketentuan tersebut dilampaui atau tidak, diperlukan suatu metode analisis pestisida karbaril yang tepat, teliti, mempunyai batas deteksi kecil, pelaksanaannya cepat dan relatif murah.

Beragam metode dapat digunakan untuk analisa karbaril, yaitu kolorimetri (Horwitz, 2000), amperometri (Du *et al.*, 2007), ELISA (Nunes, *et al.*, 1998), *flow injection-chemiluminescence* (Tsogas *et al.*, 2007), enzimatik-

kinetik (Ni *et al.*, 2007), spektrofotometri (Ni *et al.*, 2009), spektrofotometri UV (Cassela *et al.*, 2000), HPLC (Li *et al.*, 2004), LC-MS-MS (Granby *et al.*, 2004), dan GC (Shin, *et al.*, 1998). Patil dan Shingare, 1993 melaporkan analisis karbaril dengan metode KLT dengan penampak noda pereaksi fenilhidrazin.

Kromatografi lapis tipis (KLT)-Densitometri merupakan metode analisis yang masih banyak dipakai, karena dapat menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam campuran dengan waktu singkat, relatif sederhana, dan murah, serta mudah dilaksanakan dan dapat digunakan pada kadar kecil (Kantastubrata, 1991). Dalam penelitian ini dikembangkan metode KLT- densitometri yang lebih mudah dan dapat dilakukan dalam waktu singkat menggunakan penampak noda sinar ultra-violet (UV) pada panjang gelombang 280 nm. Suatu metode analisis untuk identifikasi dan kuantitasi senyawa dalam jumlah runutan haruslah mempunyai validasi yang baik, untuk itu tujuan penelitian ini adalah mengkaji validitas metode dalam hal ini sensitivitas, akurasi, dan presisi analisis karbaril dalam matriks kedelai.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Karbaril diperoleh dari Sekretariat Komisi Pestisida Bina Perlindungan Tanaman Pangan dan Hortikultura, Dirjen Pertanian dan Tanaman Pangan. Pelarut metanol, asetoneitril, kloroform, etil asetat, toluene, benzen,

NaCl, pelat KLT silicagel GF₂₅₄ dan Na₂SO₄ anhidrous kesemuanya pro analisa dari E.Merck. Kedelai diperoleh dari pasar di Surabaya.

Alat

Densitometer Shimadzu C-390, neraca analitik, alat kromatografi dan alat gelas.

Preparasi Baku dan Sampel

Larutan baku dibuat dari 100,0 mg karbaril dilarutkan metanol hingga 100,0 mL, diencerkan hingga diperoleh larutan 10 ppm hingga 500 ppm. Sampel pestisida dalam kedelai dibuat dengan cara kedelai diserbuk dan diayak dengan pengayak Mesh 40, ditimbang 25 g serbuk kedelai dan ditambahkan 2,0 mL larutan karbaril 100 ppm diaduk homogen. Digunakan serbuk kedelai tanpa karbaril sebagai blanko matriks. Replikasi dilakukan tujuh kali dan masing-masing dua kali pengamatan.

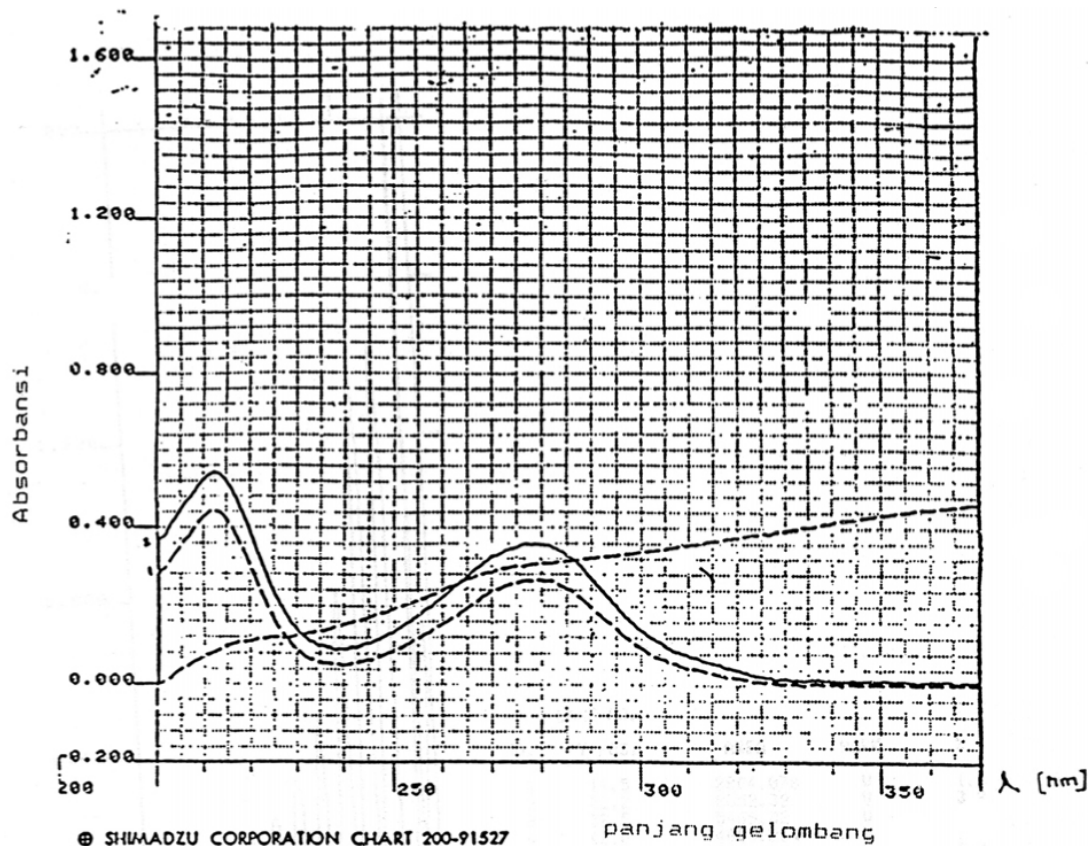
Kromatografi

Kromatografi dilakukan pada pelat KLT silicagel GF₂₅₄, untuk menotolkan digunakan mikropipet 2 μ l. Disiapkan

beberapa sistem pelarut pengembang, yaitu kloroform: benzena = 1:1 (v/v); toluen:etil asetat = 4:1 (v/v) dan 3:1 (v/v); benzena: aseton = 4:1 (v/v), selanjutnya dikembangkan dalam bejana kromatografi Camag (untuk pelat 20 \times 20 cm). Noda analit diamati dengan sinar ultra-violet pada panjang gelombang (λ) 280 nm dan pereaksi warna anisaldehyde-asam sulfat. Pengukuran dilakukan dengan Densitometer Shimadzu C-390. Identitas noda ditentukan dengan membandingkan harga R_f dan profil spektra ultraviolet pada panjang gelombang 200–370 nm (Gambar 1). Analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur absorbans reflektans noda analit pada panjang gelombang 280 nm.

Analisis Karbaril dalam Sampel

Serbuk sampel (25,0 g) diekstraksi dengan 100,0 ml asetonitril, fase asetonitril diambil 50,0 ml lalu diekstraksi dengan dua kali 100 ml kloroform dan 250 ml NaCl 0,2%. Fase kloroform dikumpulkan dan dibebaskan dari air dengan Na sulfat anhidrous, diuapkan hingga kering. Residu dilarutkan dalam 1,0 ml metanol ditotolkan 10,0 ul pada pelat KLT, dikembangkan dengan sistem pelarut pengembang terpilih. Noda yang dihasilkan diamati pada



Gambar 1. Profil Spektra ultra violet yang diukur pada λ 200–370 nm noda hasil KLT karbaril dari hasil ekstraksi (1) dengan karbaril baku (2)

Tabel 1. Sistem pelarut pengembang yang digunakan untuk analisis karbaril dalam matriks kedelai

No	Sistem pelarut pengembang (v/v)	Harga R _r	Harga R _s
1.	Aseton: benzena = 1 : 4	0,16	0,87
2.	Toluen : etil asetat = 4 : 1	0,28	1,22
3.	Toluen : etil asetat = 3 : 1	0,39	2,35
4.	Kloroform : benzena = 1 : 1	0,20	0,98

pada panjang gelombang 280 nm dan diukur luas areanya dengan densitometer.

Validasi Metode

Metode ini divalidasi linearitas, akurasi, batas deteksi dan batas kuantitasi menurut Funk *et al.*, 1992. Selektivitas metode didapat dengan dengan membandingkan profil spektra UV pada panjang gelombang 200–370 nm (Gambar 1).

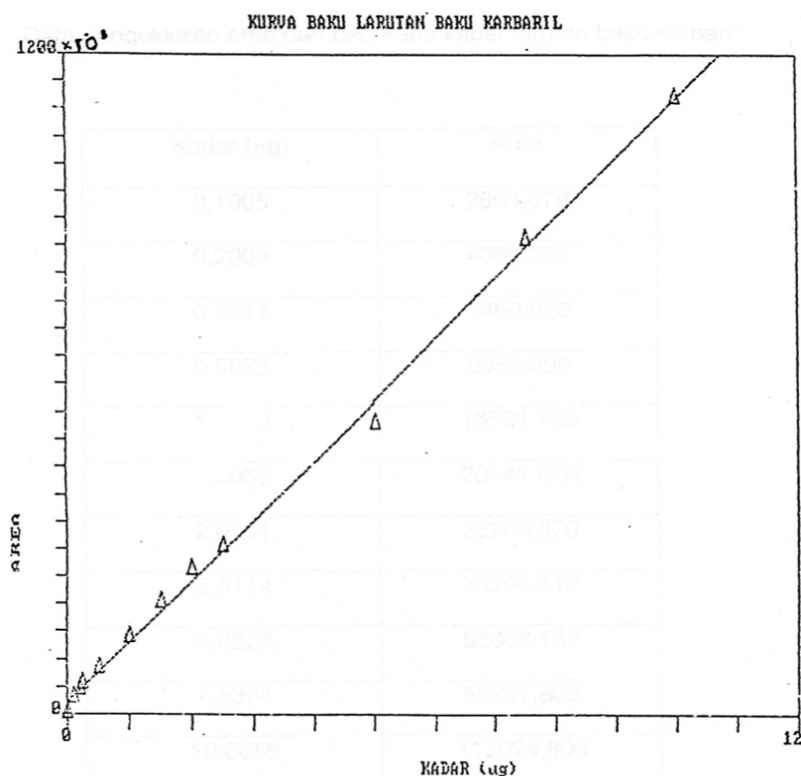
HASIL

Hasil ekstraksi karbaril dalam kedelai ditotolkan pada lempeng silica gel GF₂₅₄ dengan beberapa sistem pelarut pengembang didapatkan hasil pemisahan seperti disajikan pada Tabel 1. Profil spektrum UV karbaril baku dan dalam sampel ditunjukkan dalam Gambar 1 dengan

Tabel 2. Data pengukuran area dari beberapa kadar larutan baku karbaril

No	Kadar (ug)	Area
1.	0,2009	4086,254
2.	0,2511	5469,820
3.	0,5023	8052,390
4.	1,0046	13591,150
5.	1,5068	20141,670
6.	2,0091	25950,070
7.	2,5114	30298,310
8.	5,0228	53008,150
9.	7,5354	85717,600
10.	10,0056	112024,800

panjang gelombang maksimum diperoleh 280 nm. Uji kelurusan diperoleh antara kadar karbaril 0,2–10,0 ug per noda. Persamaan garis regresi yang diperoleh adalah $y = 10894.74x + 2438,96$ dengan harga $r = 0,9991$ ($n = 10$). *Analysis of variance* (ANOVA) uji regresi untuk linearitas diperoleh harga F hitung 9,0652 dibandingkan terhadap F tabel pada $\alpha = 0,05$ dengan db = 1;9, yaitu harga F tabel = 5,12 dalam hal ini F hitung > F tabel berarti ada hubungan linier yang bermakna antara kadar karbaril dengan area. Kurva linieritas disajikan pada Gambar 2. Data area dengan kadar larutan karbaril, disajikan di Tabel 2. Berdasarkan



Gambar 2. Kurva baku karbaril antara kadar karbaril 0,2 ug-10,0 ug per noda. Persamaan garis regresi yang diperoleh adalah $y = 10894.74x + 2438,96$ dengan harga $r = 0,9991$ ($n=10$).

perhitungan persamaan garis regresi kurva linier didapatkan harga slope 10894,74 sedang dengan metode Carr dan Wahrlich, 1990 diperoleh batas deteksi 0,055 ug dan batas kuantitasi 0,183 ug.

PEMBAHASAN

Ekstraksi karbaril dalam sampel menurut Horwitz, 2000 digunakan diklormetan-petroleum eter, namun Prihartomo melaporkan untuk analisis pestisida golongan karbamat jenis karbaril dan karbofuran dalam kedelai digunakan asetonitril-diklormetan-petroleum eter hasilnya lebih baik (Prihartomo, 1994). Dalam penelitian ini digunakan asetonitril-kloroform dan terbukti hasilnya cukup baik dengan perolehan kembali di atas 80% sehingga memenuhi persyaratan untuk analisa sampel dalam matriks biologis (Yuwono and Indrayanto, 2005).

Metode analisis dengan kromatografi dikatakan selektif bila harga R_s yaitu keterpisahan antara dua noda lebih dari 1,5 dan dalam KLT harga R_f yang baik adalah antara 0,2 hingga 0,8 (Touchstone & Dobbins, 1983). Dalam hal ini dipilih sistem pelarut pengembang, toluen : etil asetat = 3:1 (v/v) karena diperoleh hasil pemisahan komponen analit yang baik dengan harga R_f karbaril 0,39 memenuhi syarat 0,2–0,8. Noda karbaril terpisah dengan baik dari dua noda senyawa endogen kedelai dengan R_f 0,10 dan 0,23 dengan harga R_s 2,35 sehingga memenuhi juga syarat resolusi yang $>1,5$ (Yuwono & Indrayanto, 2005). Hasil kromatografi lapis tipis sampel di samping noda karbaril terdapat dua noda lain yang belum diketahui, kemungkinan pestisida lain atau senyawa endogen kedelai yang ikut terekstraksi dan terpisahkan/tereluasi. Noda karbaril sampel dibandingkan harga R_f dan panjang gelombang maksimumnya dengan baku karbaril diperoleh profil spektrum UV yang identik dengan panjang gelombang maksimum pada 280 nm, yang selanjutnya digunakan pada pengukuran secara densitometri. Dipilih panjang gelombang maksimum dalam analisis intensitas noda dari senyawa tersebut karena pada panjang gelombang tersebut merupakan absorpsi zat yang paling besar dan kesalahan pengukuran akan lebih kecil, sehingga diperoleh hasil yang lebih teliti.

Hasil penetapan kadar karbaril dalam sampel kedelai dengan tujuh kali replikasi didapatkan perolehan kembali antara 83,36% hingga 96,24% dengan perolehan rata-rata ($88,81 \pm 4,03$)%, presisinya diperoleh harga koefisien variasi (KV) 4,53%. Hal ini memenuhi persyaratan Moye yaitu perolehan kembali di atas 85% dengan presisi 10% sedang menurut Skoog presisi yang baik untuk metode KLT densitometri tidak lebih dari 5%, sementara presisi untuk sampel dalam matriks biologis dapat diterima hingga 10–15% (Yuwono & Indrayanto, 2005). Kedua persyaratan

tersebut dapat dipenuhi dengan sensitivitas yang cukup kecil yaitu batas deteksi 0,055 ug dan batas kuantitasi 0,183 ug maka metode ini dapat disarankan sebagai metode alternatif bagi penetapan kadar karbaril dalam sampel makanan atau matriks biologis selain menggunakan spektrofotometri, kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi.

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas, disimpulkan bahwa analisis karbaril secara KLT-densitometri ini selektif, akurat dengan presisi yang baik, dapat digunakan untuk penentuan karbaril pada kadar rendah dalam matriks bahan makanan.

Diharapkan metode penentuan kadar karbaril dalam kedelai dengan cara KLT-densitometri ini, dapat digunakan sebagai metode alternatif yang lebih sederhana dan lebih rendah biayanya daripada kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi.

KEPUSTAKAAN

- Anonymus, 1986. Carbamate pesticide a general introduction, WHO Environmental Health Criteria 64, Geneva 20–23, 63–64, 121.
- Anonymus, 2003. Wikipedia the free encyclopedia, Wikipedia Foundation Inc. Tgl diakses 23 April 2009.
- Cassella RJ, Garrigues S, Santelli RE, and Guardia M, 2000, Spectrophotometric determination of carbaryl by on-line elution after its preconcentration onto polyurethane foam, *Talanta*, 52: 717–725.
- Carr GP and Wahlich J, 1990. A practical approach to methods validation in pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 8: 613–618.
- Du D, Ding J, Cai J, dan Zhang A, 2007. Determination of carbaryl pesticide using amperometric acetylcholinesterase sensor formed by electrochemically deposited chitosan, *Colloids and Surfaces*, 58: 145–150
- Funk W, Damman V, and Donnervert G, 1992. *Qualitätssicherung in der analytischen chemie VH*, Weinheim 12–36, 161–180.
- Granby K, Andersen JH, dan Christensen HB, 2004. Analysis of pesticides in fruit, vegetables and cereals using methanolic extraction and detection by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 520: 165–176.
- Horwitz W (Eds), 2000. *Official methods of analysis of AOAC International*, 17 th edition, vol. 1, chapter 10, Agricultural Chemicals; Contaminants; Drugs, The Scientific Association, 5–7, 46–48.
- Kantasubrata J, 1991. *Warta Kimia Analitik, Puslitbang Kimia Terapan LIPI*, 9: 4–7.
- Li HP, Li JH, Li GC, dan Jen JF, 2004. Simultaneous determination of airborne carbamates in workplace by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Talanta*, 63: 547–553.

- Moye HA, 1995. *Analysis of pesticides residues*. John Wiley and sons, New York, 333–444.
- Ni Y, Cao DX, dan Kokot S, 2007. Simultaneous enzymatic kinetic determination of pesticides, carbaryl and phoxim, with the aid of chemometrics, *Analytica Chimica Acta*, 588: 131–139.
- Ni Y, Xiao W, dan Kokot S, 2009. Application of chemometrics methods for the simultaneous kinetic spectrophotometric determination of aminocarb and carbaryl in vegetable and water samples, *Journal of Hazardous Materials*, 168: 1239–1245.
- Nunes GS, Marco MP, Ribeiro ML, Barcelo D, 1998. Validation of an immunoassay method for the determination of traces of carbaryl in vegetable and fruit extracts by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection, *J. of Chromatography*, 823: 109–120.
- Patil VB dan Shingare MS, 1993. Thin-layer chromatographic detection of carbaryl using phenylhydrazine hydrochloride, *J. of Chromatography*, 653: 181–183.
- Prihartomo T, 1994. *Analisis residu pestisida karbaril dan karbofuran pada biji kedelai mentah pasca panen*, unpublished research.
- Shin YS, Ko M, dan Shin HS, 1998. Simultaneous quantification of insecticides including carbaryl in drinking water by gas chromatography using dual electron-capture and nitrogen–phosphorus detection, *J. of Chromatography*, 769: 285–291.
- Skoog D and West A, 1980. *Principles of instrumental analysis* 2nd ed., Saunders College, Philadelphia, 837–847.
- Tsogas GZ, Giokas DL, Nikolakopoulos PG, Vlessidis AG, dan Evmiridis NP, 2005. Determination of the pesticide carbaryl and its photodegradation kinetics in natural waters by flow injection–direct chemiluminescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 573–574: 354–359.
- Touchstone JC and Dobbins MF, 1983. *Practice of Thin Layer Chromatography*. A Wiley Interscience Publication, New York, 102–136.
- Yuwono M and Indrayanto G, 2005. Validation method of analysis by using Chromatography, *Profiles of Drugs Substances, Excipients and Related Methodology*, Vol. 32, Elsevier Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. 243–258.

Reviewer: **Dr. Nanik Siti Aminah**