

PENGOPTIMALAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DALAM ANALISIS SENYAWA DELTAMETHRIN SEBAGAI RESIDU DALAM PRODUK ASAL HEWAN

Validation of High Performance Liquid Chromatography Method to Analyze Residue of Deltamethrin in Animal Product

R. Gagak Donny Satria¹, Bambang Sumiarto², Andi Trisyono³, dan Agustina Dwi Wijayanti¹

¹Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Bagian Kesehatan Masyarakat Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Laboratorium Toksikologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

E-mail: gagak_donie@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mendapatkan prosedur atau metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang valid dan optimal dalam analisis *deltamethrin* sebagai senyawa yang berpotensi menjadi residu dalam produk hewan. Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu set KCKT Shimadzu 6.1, dengan kolom C-18 (30° C), panjang gelombang detektor UV-vis 236 nm. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah asetonitril 80% dalam akuabides yang dialirkan dengan laju 1,25 ml/menit. Hasil penelitian menghasilkan kromatogram yang terlihat menunjukkan *peak* area yang nyata terpisah dari senyawa lain. Batas deteksi diketahui pada konsentrasi 0,1 µg/ml, sedangkan batas kuantifikasi pada konsentrasi 0,5 µg/ml. Rerata luas area untuk konsentrasi 0,5; 1; 1,5; 2; 5; dan 10 µg/ml masing-masing adalah 18.255,33; 47.142,00; 55.587,00; 64.181,33; 204.269,00; dan 395.918,00 dengan persamaan garis linier $y = 39.866x - 1.719,5$ ($R = 0,99$). Hasil analisis juga menunjukkan presisi dan akurasi hasil yang baik. Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa metode yang dikembangkan pada penelitian ini mempunyai validitas yang baik dan optimal untuk analisis *deltamethrin*, yang merupakan senyawa potensial menjadi residu pada produk asal hewan.

Kata kunci: *deltamethrin*, KCKT, validasi

ABSTRACT

The purposes of this research were to develop and validate the alternative method to analyze *deltamethrin* as potential residue in animal product using high performance liquid chromatography (HPLC), based on specificity, precision, limit of detection, limit of quantification, linearity, and accuracy. High performance liquid chromatography was used as main instrument in this research. C-18 was used as the column, wavelength of UV Vis Detector was 236 nm, and 80% acetonitrile in double distilled water was used as mobile phase with 1.25 ml/min of the flow rate. The results of study showed that chromatogram's peak area displayed obviously separated from other substances. Limit of detection was at concentration 0.1 µg/ml and limit of quantification was 0.5 µg/ml. The average of peak area for each concentration of 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 5.0; and 10 µg/ml were 18,255.33; 47,142.00; 55,587.00; 64,181.33; 204,269.00; and 395,918.00 respectively, with a linear equation of $y = 39866x - 1719.5$ ($R = 0.99$). The research also showed a good precision and accuracy. It can be concluded that the method in this research was valid to analyze *deltamethrin* as a potential residue in animal product.

Key words: *deltamethrin*, HPLC, validation

PENDAHULUAN

Teknologi analisis residu pestisida sangat penting untuk dikembangkan seiring meningkatnya penggunaan pestisida dalam bidang pertanian dan peternakan, baik secara langsung maupun tidak langsung dapat memengaruhi kesehatan manusia. Pestisida piretroid dan turunannya (termasuk *deltamethrin*), merupakan jenis pestisida yang saat ini paling banyak digunakan secara luas (Jayasree *et al.*, 2003; Bahri *et al.*, 2006).

Piretroid dihasilkan secara kimiawi dan mempunyai struktur yang mirip dengan piretrin. Piretroid bersifat lebih toksik untuk insekta maupun mamalia dan mampu bertahan lebih lama di lingkungan. *Deltamethrin* merupakan pestisida piretroid sintesis dengan nama *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) yaitu (*S*)*alph-cyano-3-phenoxybenzyl* -(1*R*)-*cis*-3-(2,2-dibromovinyl)-2,2-dimethylcyclopropane carboxylate. *Deltamethrin* dianggap sebagai golongan piretroid yang paling kuat dan paling beracun (Kim *et al.*, 2007). *Deltamethrin* bersifat stabil dan dapat bertahan di lingkungan selama beberapa hari

hingga berbulan-bulan dalam kondisi penyinaran yang rendah seperti dalam kandang tertutup (Mueller, 1990; Csillik *et al.*, 2000). Konsumsi bahan makanan yang mengandung residu pestisida dalam jangka waktu lama dapat membahayakan karena menurunkan kualitas sel-sel tubuh dan menimbulkan gangguan yang lebih kompleks (Nurlaila *et al.*, 2005; Raini, 2007).

Alat analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) telah dikembangkan sebagai alat analisis residu *deltamethrin* sebagai alternatif penggunaan alat kromatografi gas atau alat lain yang lebih sulit penggunaannya. Banyak penelitian yang pernah dilakukan namun beberapa menunjukkan hasil yang kurang optimal atau menggunakan alat maupun bahan kimia yang relatif mahal atau sulit didapatkan (Kim *et al.*, 2006; Satria *et al.*, 2011). Alat KCKT dapat memisahkan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian, dan analisis senyawa nonvolatil. Kelebihan KCKT antara lain mudah dalam pelaksanaan, kemampuan resolusi yang baik, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, mudah dalam pelaksanaan, dan tidak menimbulkan

kerusakan bahan yang dianalisis. Komponen yang terdapat dalam KCKT adalah *solvent reservoir*, pompa, injektor, kolom, dan detektor (Rohman, 2009).

Validasi merupakan aksi konfirmasi bahwa prosedur analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Parameter yang biasa digunakan dalam validasi metode dengan KCKT antara lain spesifisitas, presisi, akurasi, batas deteksi (*limit of detection*), batas kuantifikasi (*limit of quantification*), linearitas, kekasaran, dan ketahanan (Epshtein, 2004; Harmita, 2004; Rohman, 2009).

Penelitian ini merupakan langkah awal yang harus dilakukan sebelum dilakukan analisis terhadap sampel lapangan. Penelitian secara umum bertujuan untuk mendapatkan prosedur atau metode KCKT yang paling valid dan optimal dalam analisis *deltamethrin* sebagai senyawa yang berpotensi menjadi residu dalam produk hewan. Diharapkan dari hasil penelitian dapat dijadikan dasar atau pedoman bagi peneliti lain yang akan mengembangkan atau melakukan analisis residu *deltamethrin* pada produk hewan menggunakan KCKT.

MATERI DAN METODE

Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu unit KCKT merk Shimadzu 6.1. dengan menggunakan kolom C-18. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel pestisida *deltamethrin* (Laboratorium Toksikologi Fakultas Pertanian UGM yang dibuat dalam beberapa konsentrasi, yaitu 10; 5; 2; 1,5; 1; 0,5; dan 0,1 µg/ml. Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril (Baker Analyzed® HPLC Reagent) dengan konsentrasi 80% dalam akuabides.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Alat KCKT dioperasikan dengan mengalirkan fase gerak sebesar 1,25 ml/menit, melalui kolom dengan temperatur 30° C. Detektor UV-vis diaktifkan dengan panjang gelombang 236 nm. Sampel *deltamethrin* dianalisis setiap konsentrasi dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Identifikasi *deltamethrin* didasarkan pada profil kromatogram dan waktu retensi munculnya area puncak, dan luas area puncak yang terbentuk. Validasi dilaksanakan

berdasarkan spesifisitas, presisi, batas deteksi atau *limit of detection* (LOD), batas kuantifikasi atau *limit of quantification* (LOQ), linieritas, dan akurasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa area puncak kromatografi untuk *deltamethrin* muncul antara menit ke 8-10. Analisis *deltamethrin* dengan berbagai konsentrasi yang berbeda menghasilkan luas area yang bervariasi pula. Semakin tinggi konsentrasi *deltamethrin* yang ditambahkan pada pelarut, maka luas area yang terbaca pada *output* akan semakin besar. Sebaliknya, semakin rendah konsentrasi *deltamethrin*, maka luas area yang terbaca pada *output* juga akan menunjukkan nilai yang semakin kecil. Contoh kromatogram analisis *deltamethrin* disajikan pada Gambar 1.

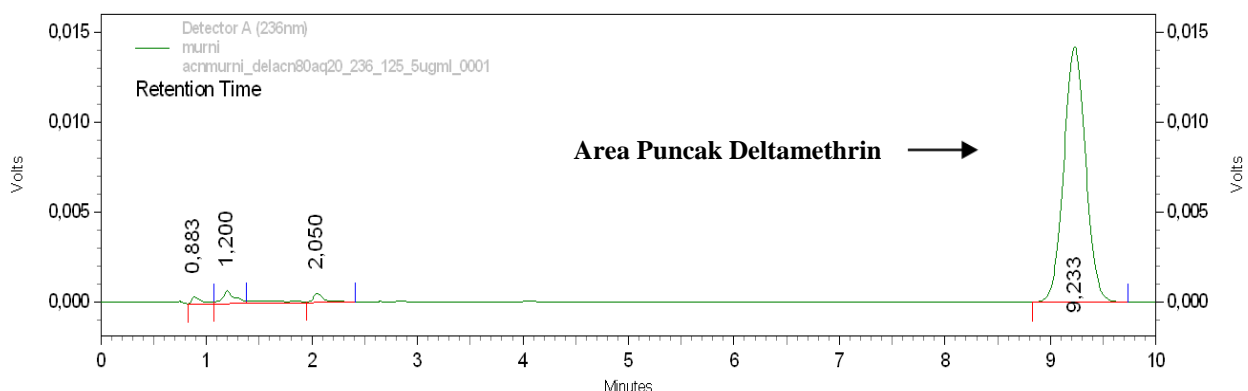
Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur hasil analitis yang dituju secara tepat dan spesifik, tanpa adanya komponen lain seperti pengganggu, prekursor sintesis, produk degradasi, dan komponen matriks (Rohman, 2009). Munculnya area puncak pada menit ke- 9,233 disajikan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 terlihat bahwa metode yang dikembangkan mampu memisahkan dan mendeteksi *deltamethrin*, yang terpresentasi melalui kemunculan area puncak yang jelas, simetris, dan tidak terganggu oleh munculnya *noise* atau pengotor dari komponen matriks lain. Dapat dikatakan bahwa metode yang dikembangkan dalam penelitian ini memiliki spesifisitas atau selektifitas yang baik.

Kemunculan area puncak *deltamethrin* atau waktu retensi pada analisis KCKT terjadi dalam rentang waktu 8-10 menit tergantung konsentrasi sampel yang dianalisis. Hasil analisis sampel setiap konsentrasi beserta perhitungan standar deviasi, standar deviasi relatif, dan akurasi disajikan pada Tabel 1.

Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan antar serangkaian hasil analisis yang diperoleh dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama (Rohman, 2009). Presisi dapat dievaluasi dengan menentukan



Gambar 1. Kromatogram pada analisis *deltamethrin* 5 µg/ml

standar deviasi relatif tiap konsentrasi. Tabel 1 menunjukkan hasil penghitungan standar deviasi relatif dan menunjukkan nilai $\leq 2\%$. Hal ini menunjukkan bahwa hasil analisis mempunyai presisi yang baik.

Batas Deteksi/Limit of Detection (LOD)

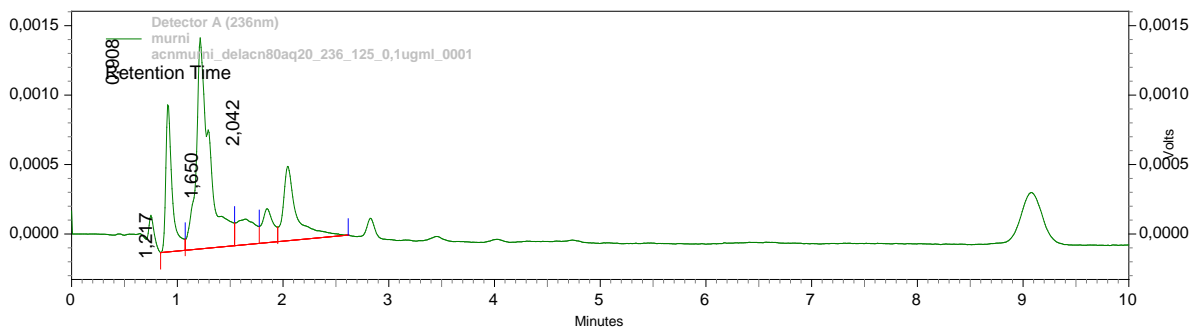
Definisi LOD yaitu konsentrasi hasil analisis terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, namun tidak selalu dapat dikuantifikasi (Snyder *et al.*, 1997; Rohman, 2009). Hasil penelitian diketahui bahwa LOD pada metode serial konsentrasi yang diujikan pada penelitian ini adalah pada konsentrasi 0,1 $\mu\text{g/ml}$, seperti yang disajikan pada Gambar 2.

Batas Kuantifikasi/Limit of Quantification (LOQ)

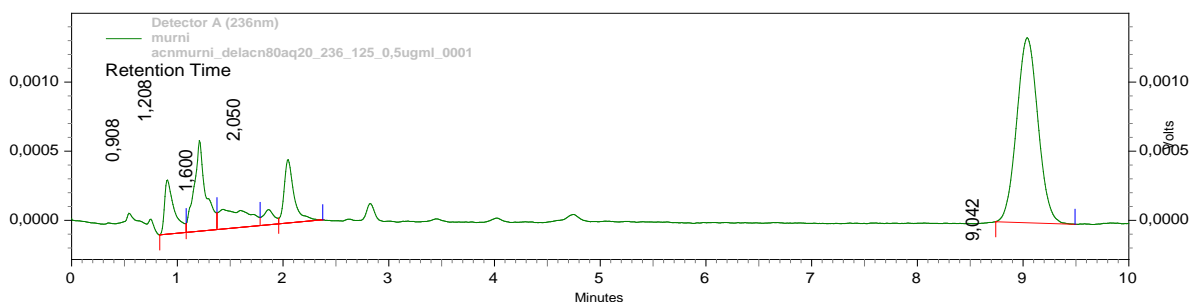
Penentuan LOQ dalam penelitian ini berdasarkan analisis dari kromatogram dari pengenceran yang ada. Definisi LOQ yaitu konsentrasi terendah suatu sampel yang dapat dianalisis secara kuantitatif (Snyder *et al.*, 1997; Rohman, 2009). Berdasarkan definisi tersebut, maka LOQ dari serial konsentrasi yang diujikan pada metode penelitian ini adalah 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi 0,5 $\mu\text{g/ml}$ merupakan batas terkecil konsentrasi sampel yang dapat memunculkan area puncak serta terkuantifikasi besarnya luas area pada kromatogram seperti yang disajikan pada Gambar 3.

Tabel 1. Hasil analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) terhadap deltamethrin dan perhitungan vitalnya

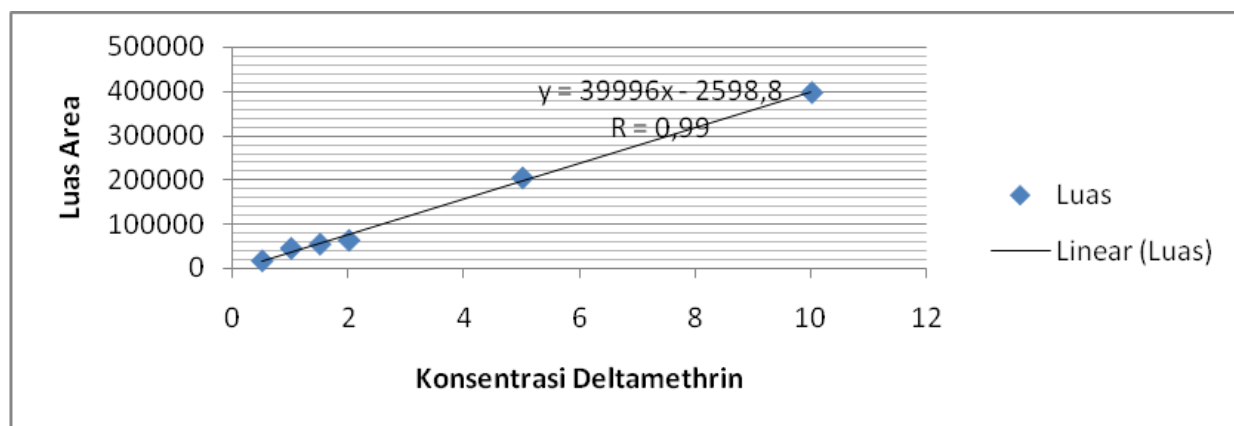
Konsentrasi Deltamethrin	Luas Area	Rerata Luas Area	Standar Deviasi	RSD	Akurasi
0,5 $\mu\text{g/ml}$	18.777	18.255,3333	458,3758	0,0251	100%
	18.072				
	17.917				
1 $\mu\text{g/ml}$	46.689	46.119,7000	524,7466	0,0111	120%
	47.717				
	47.020				
1,5 $\mu\text{g/ml}$	55.150	55.587,0000	405,8189	0,0073	95%
	55.659				
	55.952				
2 $\mu\text{g/ml}$	64.947	64.181,3333	860,5442	0,0134	82%
	63.250				
	64.347				
5 $\mu\text{g/ml}$	204.125	204.269,0000	351,8423	0,0017	103%
	204.012				
	204.670				
10 $\mu\text{g/ml}$	397.307	395.918,0000	1.809,2940	0,0044	99%
	396.575				
	393.872				



Gambar 2. Kromatogram deltamethrin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sebagai LOD



Gambar 3. Kromatogram deltamethrin 0,5 $\mu\text{g/ml}$ sebagai LOQ



Gambar 4. Grafik linieritas analisis kromatogram senyawa *deltamethrin*

Linieritas

Linieritas merupakan salah satu tolok ukur utama baik buruknya alur pengujian dibandingkan dengan perkiraan konsentrasi pada garis lurus. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi dengan persamaan $y = a + bx$, yang menghubungkan antara respons (y) dengan konsentrasi (x) (Snyder *et al.*, 1997). Hasil analisis kurva baku hasil analisis disajikan Gambar 4. Luas area puncak paling tinggi dicapai oleh *deltamethrin* dengan konsentrasi paling tinggi yaitu 10 $\mu\text{g/ml}$, diikuti oleh konsentrasi 5; 2; 1,5; 1 $\mu\text{g/ml}$, dan yang paling rendah adalah konsentrasi 0,5 $\mu\text{g/ml}$, dengan persamaan linear $y = 39.866x - 1.719,5$ ($R = 0,99$).

Berdasarkan kurva pada Gambar 4 diketahui bahwa metode analisis terhadap pestisida *deltamethrin* menunjukkan adanya hubungan yang linier antara konsentrasi sampel *deltamethrin* yang dianalisis dengan luas area puncak yang terjadi. Hal ini ditunjukkan oleh koefisien korelasi yang mendekati 1.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa metode analisis *deltamethrin* menggunakan alat KCKT dengan penggunaan fase gerak asetonitril 80% dalam akuabides dengan laju alir 1,25 ml/menit, kolom C-18 (30° C), dan panjang gelombang detektor UV-vis 236 nm optimal dan valid untuk digunakan sebagai alat analisis senyawa *deltamethrin*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bahri, S., S. Yulvan, dan Indraningsih. 2006. Beberapa faktor yang mempengaruhi keamanan pangan asal ternak di Indonesia. *Wartazoa* 12(2):47-64.
- Csillik, B., J. Fazakas, J. Nemcsok, and E. Knyihar-Csillik. 2000. **Effect of The Pesticide Deltamethrin on The Mauthner Cells of Lake Balaton Fish**. Pubmed, U.S.
- Epshtein, N.A. 2004. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control validation of HPLC technique for pharmaceutical analysis. *Pharmaceutic. Chem. J.* 38(44):40-56
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaannya validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 1(3):117-135.
- Jayasree, U., A.G. Reddy, K.S. Reddy, Y. Anjaneyulu, and B. Kalakumar. 2003. Evaluation of vitamin E against deltamethrin toxicity in broiler chicks. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 47(4):447-452.
- Kim, K.B., M.G. Bartlett, S.S. Anand, J.V. Bruckner, and H.J. Kim. 2006. Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. *J. Chromatography.* 834:141-148.
- Kim, K.B., S.S. Anand, S. Muralidhara, H.J. Kim, and J.V. Bruckner. 2007. Formulation-dependent toxicokinetics explains differences in the GI absorption, bioavailability, and acute neurotoxicity of deltamethrin in rats. *J. Toxicol.* 234:194-202.
- Mueller, D. 1990. Toxicology and environmental fate of syntetic pyrethroid. *J. Pesticide Reform.* 10(3):32-71.
- Nurlaila, A.D. Imono, dan M. Edy. 2005. Evaluasi penatalaksanaan terapi keracunan pestisida pasien rawat inap di Rumah Sakit A Yogyakarta periode Januari 2001 sampai dengan Desember 2002. *Majalah Farmasi Indonesia.* 16(3):149-154.
- Raini, M. 2007. Toksikologi pestisida dan penanganan akibat keracunan pestisida. *Media Litbang Kesehatan.* XVII(3):10-18.
- Rohman, A. 2009. **Kromatografi untuk Analisis Obat**. Graha Ilmu, Yogyakarta.
- Satria, G.D., A.D. Wijayanti, P. Wikan, A. Nurul, D. Prana, and R. Acintya. 2011. Chromatogram Analysis to Detect The Deltamethrin Added in The Muscle of Chicken Using The High Performance Liquid Chromatography. **Proceeding International Advance Technology on Veterinary and Life Scientist.** Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta:313-318.
- Snyder, L.R., J.K. Joseph, and L.G. Joseph. 1997. **Practical HPLC Method Development**. John Wiley & Sons Inc., New York.