

PENENTUAN KONDISI OPTIMUM HPLC UNTUK PEMISAHAN RESIDU PESTISIDA IMIDAKLOPRID, PROFENOFOS DAN DELTAMETRIN PADA CABAI (*Capsicum annum*)

*DETERMINATION OF OPTIMUM CONDITION OF HPLC FOR SEPARATION OF PESTISIDE RESIDUE OF IMIDACLOPRID, PROFENOFOS AND DELTAMETHRIN ON CHILLI (*Capsicum annum*)*

Nurhamidah

Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP Universitas Bengkulu

ABSTRACT

The research aim was to determine the optimum ratio and flow rate of mobile phase of acetonitrile: water for separation of pesticide residue of imidacloprid, profenofos and deltamethrin simultaneously with HPLC. The compromise wavelength of the three of residues was measured with UV-VIS spectrophotometer. The ratio of acetonitrile:water consisted of 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60 and 30 : 70 v/v, and the flow rate of the mobile phase consisted of 0,5, 0,75 and 1 mL minutes⁻¹, respectively. The results show the optimum mobile phase was achieved at a ratio of 60:40 v/v and at a wavelength of 270 nm with retention time of imidacloprid, profenofos and deltamethrin components achieved at 3.0, 6.2 and 17.1 minutes, respectively. The higher ratio of acetonitrile: water and higher mobile phase resulted in accelerating its retention time and a good separation of imidacloprid was not achieved. An unsatisfied separation was also obtained when smaller ratio of acetonitrile: water and lower mobile phase was used. It occurred due to higher deltamethrin retention time.

Key words chilli, pesticide residue, imidacloprid, profenofos, deltamethrin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan komposisi dan laju alir fasa gerak asetonitril air pada pemisahan komponen aktif imidakloprid, profenofos dan deltametrin secara simultan dengan HPLC. Panjang gelombang kompromis untuk ketiga komponen ditentukan melalui pengukuran dengan spektrofotometer UV-VIS. Komposisi optimum ditentukan dengan memvariasikan asetonitril : air dengan perbandingan 70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60, dan 30 : 70 v/v dan laju alir 0,5, 0,75 dan 1 mL menit⁻¹. Hasil Penelitian menunjukkan bahwa komposisi fasa gerak yang optimum 60 : 40 v/v dan laju alir 0,75 ml menit⁻¹ pada panjang gelombang 270 nm, dengan waktu retensi imidakloprid, profenofos dan deltametrin berturut-turut 3 menit, 6,2 menit dan 17,1 menit. Penggunaan komposisi asetonitril yang lebih besar dan laju alir yang lebih tinggi akan mempercepat waktu retensi, sehingga imidakloprid tidak terpisah baik dengan profenofos sedangkan penggunaan komposisi asetonitril yang lebih kecil dan laju alir yang lebih rendah pemisahan kurang baik karena waktu retensi deltametrin menjadi lebih besar.

Kata kunci : cabai, komposisi cabai, laju alir, imidakloprid, profenofos, deltamethrin

PENDAHULUAN

Pestisida merupakan bahan kimia beracun terhadap serangga, gulma, jamur dan hama lain yang tidak disukai. Kebanyakan pestisida berpotensi membahayakan bagi kesehatan manusia dan dapat menyebabkan kanker, cacat lahir, perubahan dalam material yang dapat

diturunkan kepada generasi berikutnya, kerusakan syaraf dan sebagainya (Riza, 1994).

Beberapa peristiwa keracunan oleh senyawa pestisida telah terjadi di berbagai belahan dunia. Biasanya pestisida masuk ke dalam tubuh melalui saluran pernafasan dan absorpsi kulit, tetapi masalah utama bagi kesehatan masyarakat adalah adanya residu pestisida dalam makanan, karena

ini dapat melibatkan sejumlah besar orang selama jangka waktu yang panjang (Frank, 1994).

Memasuki tahun 90-an, metoda untuk penentuan multi residu pestisida berkembang dengan pesat. Metoda High Performance Liquid Chromatography menggunakan kolom C_{18} dan sistim deteksi UV mulai diminati, karena metoda ini sederhana, skala kecil dan kemajuan dibidang ekstraksi dan clean up (Sherwa, 1993).

Metoda High Performance Liquid Chromatography (HPLC), merupakan teknik kromatografi cair kinerja tinggi yang berasal dari kromatografi kolom klasik, di mana teknik kromatografi ini bertambah maju setelah HPLC dikemas dengan bead yang sangat kecil ($\sim 10 \mu\text{m}$) dan beroperasi pada tekanan tinggi (Weiss, 1995).

HPLC merupakan suatu metode yang sensitif dan akurat untuk penentuan kuantitatif serta baik untuk pemisahan senyawa yang tidak mudah menguap seperti asam amino, protein, pestisida dan lain-lain (Skoog, 1985). Pemisahan dengan HPLC mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional seperti waktu analisis yang cepat, biaya yang rendah dan kemungkinan untuk menganalisis sampel yang tidak stabil (Ishii, 1988).

Pada saat ini, HPLC merupakan metoda kromatografi cair yang pemakaiannya telah sangat berkembang, baik untuk analisis rutin maupun untuk preparatif pada banyak laboratorium. Dibandingkan dengan kromatografi gas, HPLC dioperasikan pada suhu kamar, di mana senyawa yang tidak tahan panas dapat ditentukan dengan mudah dan sifat fasa gerak dapat diubah dengan merubah komposisi dari fasa gerak yang digunakan (Gritter *et al.*, 1991).

Sejumlah penelitian mengenai penentuan residu pestisida telah dilakukan. Peresz *et al.* (2000) telah menggunakan metoda off-line SPE dan on-line fasa terbalik kromatografi cair yang digabung dengan kromatografi gas untuk menentukan residu pestisida dalam air. Sebagai fasa gerak digunakan campuran metanol : air (70 ; 30) dengan limit deteksi $0.04 - 1.5 \mu\text{g L}^{-1}$.

Heberle *et al.* (2000) menggunakan metoda GC-HPLC dengan carbopack B sebagai bahan SPE-nya untuk penentuan herbisida acetanilide,

oxanilic dan sulfonic acid dalam air tanah dan air permukaan. Limit deteksi yang diperoleh dalam penelitian ini berturut-turut $1 - 8 \mu\text{g L}^{-1}$, $1 - 7 \mu\text{g L}^{-1}$ dan $10 - 90 \mu\text{g L}^{-1}$.

Pichon *et al.* (1995) juga telah melakukan penelitian penentuan pestisida phenylurea dalam air minum dan air permukaan dengan metoda on-line prekonsentrasi dan kromatografi cair menggunakan silica-based immunosorbent. Fasa gerak yang digunakan asetonitril 20 – 80%, dengan limit deteksi bekisar 0.05 dan $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ untuk 10 senyawa fenilurea dalam 13 campuran.

Habiba *et al.* (1992) juga telah melakukan penentuan residu pestisida Curacron dengan bahan aktif profenofos dari golongan organofosfat dalam sayuran kentang secara HPLC. Fasa gerak yang digunakan adalah asetonitril air (60 : 40 v/v) dengan laju alir $0.7 \text{ mL menit}^{-1}$.

Ishii *et al.* (1994) juga telah melakukan penentuan residu pestisida imidaklopid dalam beras dan mentimun secara HPLC. Fasa gerak yang digunakan dalam penentuan residu ini adalah asetonitril air (80 : 20 v/v) dengan laju alir $1.0 \text{ mL menit}^{-1}$ dan panjang gelombang 270 nm. Rekoveri yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 75 – 109% dan limit deteksi berturut-turut 0.005, 0.01 dan 0.02 mg kg^{-1} untuk tanaman hortikultura, jerami dan tanah.

Penentuan pestisida deltametrin dari golongan pyrethroid secara HPLC juga telah dilakukan oleh Pavan *et al.* (1999). Penentuan deltametrin ini dilakukan dalam air buangan sapi dengan fasa gerak asetonitril : air (80 : 20 v/v) dan laju alir 1 mL menit^{-1} . Rekoveri yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 81.02 % sampai 84.95% dengan limit deteksi 0.2 mg L^{-1} .

Di Indonesia pestisida curacron dengan komponen aktif profenofos, confidor dengan komponen aktif imidaklopid dan decis dengan komponen aktif deltametrin banyak digunakan petani untuk mengendalikan hama pada tanaman cabai, jeruk, padi dan tanaman hortikultura lainnya (Deptan, 1997b).

Analisis dengan HPLC, fasa gerak yang digunakan harus bebas dari gas, sehingga perlu dilakukan proses penghilangan gas (*degassing*) terlebih dahulu sebelum alat dioperasikan. Proses

penghilangan gas ini diperlukan untuk menghindari noise pada detektor terutama fasa organik berair. Proses penghilangan gas ini juga diperlukan untuk menghindari terbentuknya gelembung udara jika pelarut yang berbeda dicampurkan. Degassing dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti pemukiman di atas fasa gerak, pemanasan sambil diaduk, ultrasonic dan lainnya (Poole, 1985).

Suatu larutan dapat digunakan sebagai fasa gerak jika memenuhi syarat-syarat seperti yang tercantum pada Skoog (1985).

METODE PENELITIAN

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum imidakloprid, profenofos dan deltametrin

Larutan imidakloprid dengan konsentrasi 10 mg L⁻¹ dimasukkan ke dalam kuvet yang telah disediakan, kemudian ditentukan panjang gelombang serapan maksimumnya. Larutan profenofos dengan konsentrasi 50 mg L⁻¹ dan larutan deltametrin dengan konsentrasi 10 mg L⁻¹ disiapkan seperti di atas kemudian dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang kompromis dibuat dengan menggabungkan ketiga kurva panjang gelombang serapan maksimum dari ketiga komponen di atas.

Penentuan waktu retensi masing-masing komponen dengan variasi komposisi fasa gerak dan laju alir pada metoda HPLC.

Larutan fasa gerak Asetonitril Air dengan perbandingan (70 : 30, 60 : 40, 50 : 50, 40 : 60, dan 30 : 70 V/V) yang telah dihilangkan gasnya dengan vakum sonic dialirkan terus dengan laju alir tertentu (0.5, 0.75 dan 1 mL menit⁻¹) pada alat HPLC. Standar imidakloprid (10mg L⁻¹), profenofos (10 mg L⁻¹) dan deltametrine (10 mg L⁻¹) sebanyak 20 mL disuntikkan ke dalam loop sampel pada HPLC, katup diubah, tekan run terus. Komponen aktif didorong oleh fasa gerak ke kolom ODS dan selanjutnya ke detektor UV, pada detektor dapat dilihat nilai absorban, waktu retensi dicatat saat absorban komponen turun.

Pembuatan kurva kalibrasi standar

Kurva kalibrasi standar untuk penentuan komponen aktif imidakloprid, profenofos dan deltametrin ini dibuat dengan memvariasikan konsentrasi larutan masing-masing komponen dalam rentangan konsentrasi 0-10 mg L⁻¹ dengan selang konsentrasi 2 mg L⁻¹. Sejalan dengan pengukuran larutan standar ini dilakukan pengukuran terhadap satu konsentarsi standar masing-masing komponen yaitu pada 10 mg L⁻¹ dengan 6 kali pengulangan.

Pemisahan komponen aktif dalam sampel

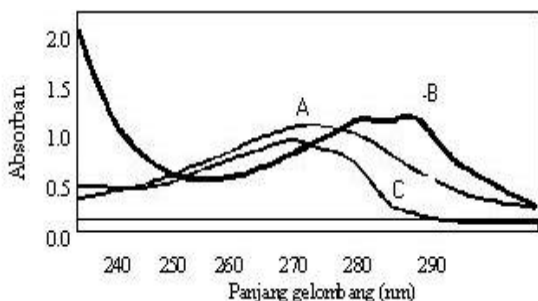
Sampel diambil secara acak di daerah pusat produksi sayuran di daerah Padang Luar Bukittinggi. Sebelum sampel diinjeksikan ke dalam loop, terlebih dahulu diekstraksi dan diprekonsentrasi. Larutan sampel yang telah diekstrak diinjeksikan sebanyak 20 mL ke dalam loop sampel pada sistim HPLC. Katup loop diubah, sampel didorong oleh fasa gerak yang mengalir terus ke kolom okta desil silana (ODS) dan selanjutnya ke detektor. Signal dari detektor dikirim ke print out dan diubah menjadi kromatogram (Deptan, 1997a).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengukuran panjang gelombang maksimum masing-masing komponen

Pengukuran panjang gelombang maksimum dari masing-masing komponen aktif pestisida imidakloprid, profenofos dan deltametrin dilakukan dengan Spektrofotometer UV-visible S 1000 Secomam. Dari hasil pengukuran didapat panjang gelombang maksimum dari imidakloprid pada 270.8 nm, profenofos pada 277.8 nm sedangkan deltametrin pada 267.6 nm. Karena daerah serapan maksimum masing-masing komponen tidak terlalu berjauhan, ketiga komponen tersebut dapat dipisahkan secara simultan. Kemudian dilakukan penentuan panjang gelombang optimum atau panjang gelombang kompromis dari ketiga komponen aktif, yang

berguna untuk melihat pada panjang gelombang berapa komponen imidaklopid, profenofos dan deltametrin sama-sama dapat menyerap sehingga pemisahan dapat menggunakan metoda HPLC dapat dilakukan. Dari hasil pengukuran didapat panjang gelombang optimum pemisahan pada 270 nm, seperti terlihat pada Gambar 1.



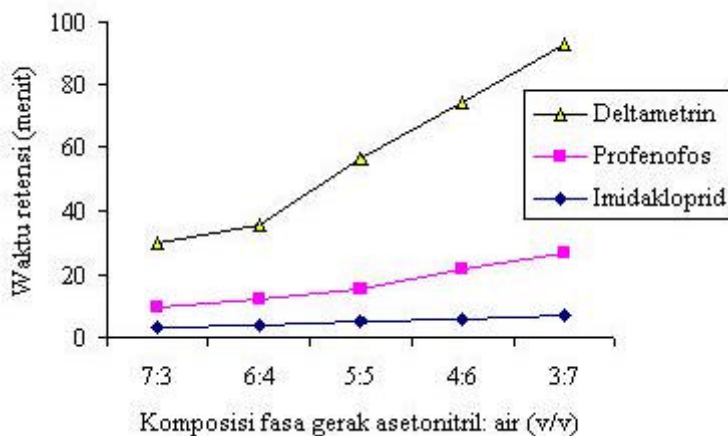
Gambar. 1. Spektrum serapan komponen aktif (a) imidaklopid 10 mg L⁻¹, (b) profenofos 50 mg L⁻¹ dan (c) deltametrin 10 mg L⁻¹

Dari spektrum serapan komponen aktif imidaklopid, profenofos dan deltametrin di atas

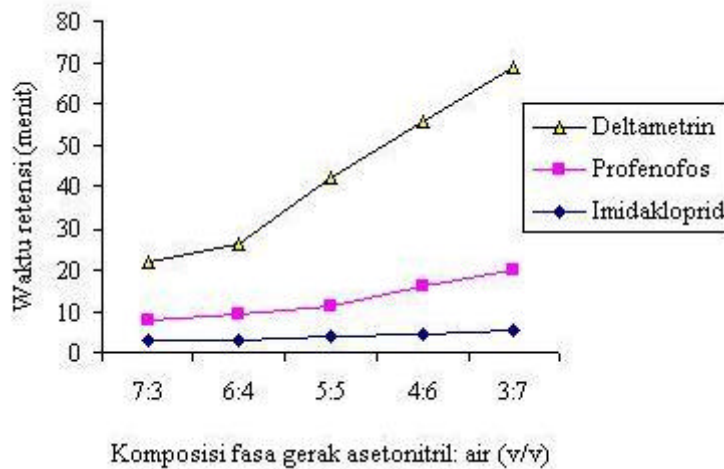
dapat dilihat bahwa pada panjang gelombang 270 nm, masing-masing komponen dapat menyerap dengan baik sehingga panjang gelombang 270 nm dapat dijadikan sebagai panjang gelombang optimum pemisahan. Jika panjang gelombang optimum pemisahan berada dibawah 270 nm, maka serapan komponen profenofos akan menjadi kecil sedangkan jika berada di atas 270 nm, maka serapan komponen deltametrin yang akan menjadi lebih kecil.

Penentuan komposisi fasa gerak dan laju alir yang optimum menggunakan metoda HPLC

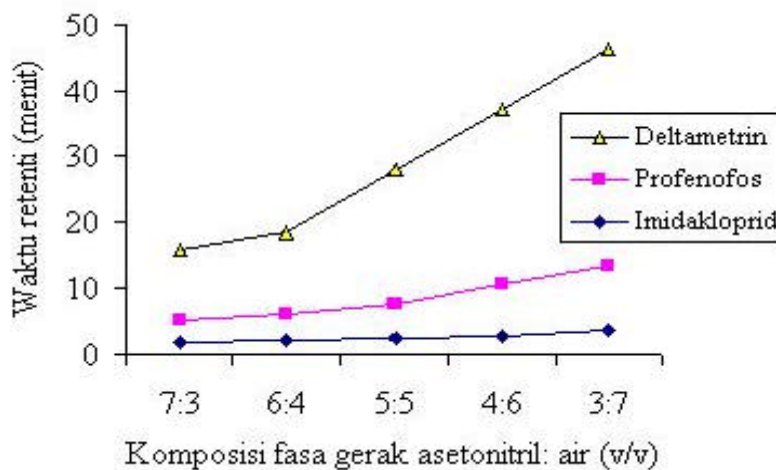
Kondisi optimum fasa gerak yang akan ditentukan adalah komposisi fasa gerak asetonitril air dan laju alirnya. Penentuan komposisi dan laju alir dilakukan dengan cara memvariasikan komposisi fasa gerak asetonitril air dari 70:30 v/v sampai 30:70 v/v dan variasi laju alir pada 0.5 mL menit⁻¹, 0.75 mL menit⁻¹ dan 1 mL menit⁻¹ pada konsentrasi masing-masing komponen aktif 10 mg L⁻¹.



Gambar 2. Kurva hubungan waktu retensi dengan komposisi fasa gerak. Laju alir 0.5 mL menit⁻¹, λ 270 nm dan konsentrasi masing-masing pestisida 10 mg L⁻¹.



Gambar 3. Kurva hubungan waktu retensi dengan komposisi fasa gerak. Laju alir 0.75 mL menit⁻¹, λ 270 nm dan konsentrasi masing-masing pestisida 10 mg L⁻¹.



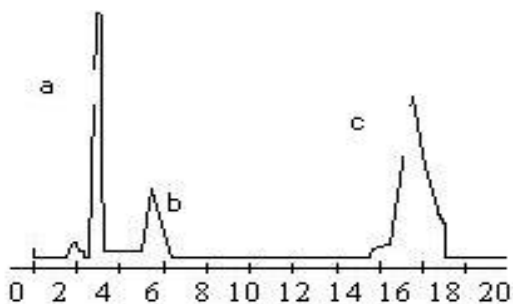
Gambar 4. Kurva hubungan waktu retensi dengan komposisi fasa gerak. Laju alir 1 mL menit⁻¹, λ 270 nm dan konsentrasi masing-masing pestisida 10 mg L⁻¹.

Dari data hasil pengukuran di atas, diperoleh bahwa komposisi fasa gerak asetonitril air yang baik digunakan untuk pemisahan komponen imidaklopid, profenofos dan deltametrin dalam campuran 60 : 40 v/v dengan laju alir 0.75 mL menit⁻¹. Pada laju alir fasa gerak 0.5 mL menit⁻¹ komponen sudah terpisah dengan baik, tetapi waktu yang diperlukan untuk pemisahan komponen relatif lama, sedangkan bila laju alir yang digunakan 1 mL menit⁻¹, pada komposisi 70 : 30 dan 60 : 40 v/v waktu yang digunakan untuk pemisahan komponen lebih kecil, tetapi

komponen aktif imidaklopid dan profenofos kurang terpisah dengan baik.

Pada komposisi fasa gerak asetonitril air 60 : 40 v/v dan laju alir 0.75 mL menit⁻¹ diperoleh waktu retensi masing-masing komponen imidaklopid, profenofos dan deltametrin berturut-turut adalah sekitar 3 menit, 6.2 menit dan 17.1 menit, seperti yang terlihat pada Gambar 5. Waktu retensi imidaklopid yang diperoleh ini agak berbeda dari hasil yang diperoleh oleh Ishii *et al.* (1994) yaitu 1.2 menit. Waktu retensi untuk profenofos juga berbeda dari hasil yang diperoleh

oleh Habiba *et al.* (1992) yaitu 7.84 menit. Demikian juga waktu retensi yang diperoleh oleh Pavan *et al.* (1999) yaitu 11.2 menit untuk komponen deltametrin. Hal ini disebabkan karena laju alir dan komposisi fasa gerak yang digunakan berbeda



Gambar 5. Kromatogram pemisahan komponen aktif pestisida pada komposisi fasa gerak asetonitril air (60:40 v/v), laju alir 0,75mL menit⁻¹, λ 270nm, volume injeksi 20 μ L, chart speed 0,5 cm menit⁻¹ dan konsentrasi masing-masing komponen aktif 10 mg L⁻¹ (a) imidakloprid, (b) profenofos, dan (c) deltametrin

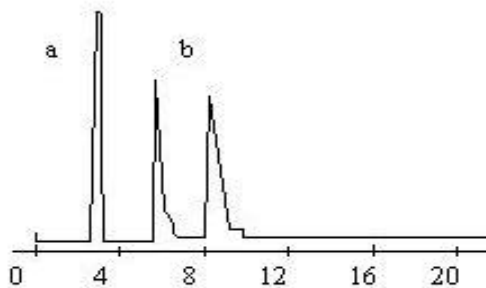
Persamaan regresi masing-masing komponen

Persamaan regresi diperoleh dari hubungan konsentrasi masing-masing komponen aktif imidakloprid, profenofos dan deltametrin (x) dengan serapan (y) yang diukur pada panjang gelombang 270 nm. Komposisi fasa gerak asetonitril air 60 : 40 v/v dan laju alir 0.75 mL menit⁻¹. Variasi konsentrasi imidakloprid, profenofos dan deltametrin yang digunakan 2 mg L⁻¹ sampai 10 mg L⁻¹.

Dari hasil perhitungan diperoleh persamaan garis regresi masing-masing komponen, koefisien korelasi dan koefisien determinasi seperti yang dicantumkan dalam Tabel 1.

Sejalan dengan pengukuran absorban standar, diukur pula satu larutan standar masing-masing komponen pada konsentrasi 10 mg L⁻¹ sebanyak 6 kali ulangan untuk menentukan standar deviasi relatif dari masing-masing komponen. Dari hasil perhitungan diperoleh standar deviasi relatif (SDR) dari waktu retensi masing-masing komponen imidakloprid, profenofos dan deltametrin berturut-turut adalah 1.37%, 1.67% dan 1.22%, sedangkan standar deviasi relatif dari absorban adalah 0.16%, 0.10% dan 0.14%.

Pemisahan komponen aktif dalam sampel cabai



Gambar 6. Kromatogram pemisahan komponen aktif dalam sampel komposisi fasa gerak asetonitril air (60:40 v/v), laju alir 0,75 mL menit⁻¹, λ 270 nm, chart speed 0,5 cm menit⁻¹ dan volume injeksi 20 mL. puncak (a) imidakloprid, (b) profenofos

Tabel 1. Persamaan regresi, korelasi dan koefisien determinasi masing-masing komponen aktif pestisida

| Komponen aktif | Persamaan regresi | r | r ² |
|----------------|---------------------------|--------|----------------|
| Imidakloprid | Y = 0.000380 + 0.010010 X | 0.9995 | 0.999 |
| Profenofos | Y = 0.000024 + 0.001930 X | 0.9991 | 0.998 |
| Deltametrin | Y = -0.00088 + 0.007740 X | 0.9994 | 0.999 |

Dari kromatogram pemisahan komponen aktif dalam sampel di atas, didapatkan tiga buah puncak yang mana puncak pertama terdapat pada waktu retensi 3.02 menit yang merupakan puncak komponen aktif imidakloprid, puncak kedua

terdapat pada waktu retensi 6.17 menit yang merupakan puncak profenofos, sedangkan puncak ketiga tidak diketahui komponen tersebut yang terdapat pada waktu retensi 8.21 menit.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan yaitu, panjang gelombang kompromis untuk pemisahan komponen aktif imidakloprid, profenofos dan deltametrin secara simultan adalah 270 nm. Komposisi fasa gerak asetonitril : air yang baik digunakan untuk pemisahan imidakloprid, profenofos dan deltametrin secara HPLC adalah 60 : 40 v/v dengan laju alir 0.75 mL menit⁻¹, dengan waktu retensi komponen berturut-turut 3 menit, 6.2 menit dan 17.1 menit. Penggunaan komposisi asetonitril yang lebih besar dan laju alir yang lebih tinggi akan memperkecil waktu retensi sehingga komponen aktif imidakloprid dan profenofos tidak terpisah dengan baik, demikian juga jika komposisi asetonitril yang digunakan lebih kecil dan laju alir lebih rendah pemisahan juga kurang baik karena waktu retensi deltametrin terlalu besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Deptan. 1997a. Metode Pengujian Residu Pestisida Dalam Hasil Pertanian. Komisi Pestisida Departemen Pertanian, Jakarta.
- Deptan 1997b. Pestisida Untuk Pertanian dan Kehutanan. Komisi Pestisida Departemen Pertanian, Jakarta.
- Frank C. Lu. 1994. Toksikologi Dasar. Universitas Indonesia Jakarta.
- Gritter, R. J., J. M. Bobbitt, A. E. Schwarting. 1985. Introduction to Chromatography. Halden Day Inc Oakland, USA. *Diterjemahan* oleh K. Padmawinata. 1991. Pengantar Kromatografi. ITB Bandung.
- Habiba, R., A. H. M. Ali and S. M. Ismail. 1992. Biochemical Effect of Profenofos Residues in Potatoes, J. Agric. Food Chem, 40, 1852-1855.
- Heberle, S. A., D. S. Aga, R. Hany and S.R. Muller. 2000. Simultaneous Quantification of Acetocnilde Herbicide and their Oxanilic and Sulfonic Acid Metabolite in Natural Waters. Anal. Chem. 72 : 840-845
- Ishii, D. 1988. Introduction to Microscale High - Performance Liquid Chromatography, VCH Publishers Inc, New York.
- Ishii, Y., I. Kobori, Y. Araki, S. Kurogochi, K. Iwaya and S. Kagabu, 1994. HPLC Determination of The New Insecticide Imidacloprid and Its Behavior in Rice and Cucumber. J. Agric. Food Chem. 42, 2917 – 2921
- Pavan, F.A., R.M. Dallago, R.Zanella and A.F. Martins. 1999. Determination of Deltamethrin in Cattle Dipping Baths by High Performance Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem. 47 : 174 – 176
- Perez, M., J. Alario, A. Varquez and J. Villeer. 2000. Pesticide Residue Analysis by off-line SPE and on-line Reverser phase LC-GC Using The Thought Oven Transfer Adsorption/Desorption Interface. Anal. Chem. 72 : 846-852.
- Pichon, V, L. Chen., and M.C. Hennion. 1995. On-line Preconcentration and Liquid Chromatographic Analysis of Phenylurea Pesticides in Environmental Water Using A Silica-Based Immunosorbent. Anal. Chem. Acta. 311, 429-436.
- Poole, C.F. and S.K. Poole. 1994. 1st ed. Chromatography Today. Elsevier Science B.V. Netherlands. pp. 545-550.
- Riza, V.T. dan Gayatri. 1994. Ingatlah Bahaya Pestisida. Bunga Rampai Residu Pestisida dan Alternatifnya. Pesticide Action Network (PAN), Jakarta.
- Sherwa, J. 1993. Pesticide. Anal. Chem. 65: 40R-54R
- Skoog, D. A. 1985. Principles of Instrumental Analysis. 3rded. Saunders Golden Sumburst Series, New York.
- Weiss, J. 1995. Ion Chromatography. 2nded. VCH Publisher Inc, New York.