

Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Analisis Residu Pestisida Diazinon dalam Sawi Hijau (*Brassica juncea L.*)

Yeni Maulidah Muflihah*, Aniesa Fithria, Dwi Indarti

Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Jember

*Email: yeni.maulidah@gmail.com

ABSTRAK

Densitometric thin layer chromatography, a simple, sensitive, and reproducible separation method has been used for analyzing diazinone residue from green mustard (*Brassica juncea L.*). The plants was sprayed by diazinone pesticide and harvested in vary period. Diazinone from samples were isolated by maceration method using n-hexane as solvent. Qualitative and quantitative analysis were performed on an aluminum plate that coated with silica gel 60 F254 as a stationary phase. Elution were carried out at room temperature with elution length of 9.5 cm in a 10 cm x 5 cm x 10 cm chamber and volume of 40 μ L. Eluen was a mixture of hexane: ethyl acetate (18: 1,v /v), Camag 3 densitometric scanner was used to scan the chromatogram generated at a wavelength of 247 nm. The resulting data showed Rf value for diazinon either a standard or a sample was 0.298 ± 0.0035 . Linearity obtained at range of concentration 40 ng to 320 ng, with a correlation coefficient of 0.974. A detection limit (LOD) of 88.44 ng/spot and the limit of quantitation (LOQ)268.03 ng/spot. Recovery percentage for the addition of standard diazinon were 100.25%, 100% and 88.33%. Diazinone residue levels in greens mustard on days 1, 3, 5 and 7 days after spraying diazinon were respectively 0,305; 0,256; 0,019; and 0,017 mg / kg.

Keywords: TLC, diazinone, green mustard, densitometry

PENDAHULUAN

Diazinon (o,o-diethyl-o[2-isopropil-6-metil pirimidinil]phosphorotioate) lebih dikenal dengan nama dagang Basudin, Dazzel, Nucidol, Spectracide, Diazinon 600 EC, Agrostar 600 EC dan Prozinon 600 EC, merupakan salah satu pestisida golongan organofosfat yang banyak digunakan untuk melindungi tanaman. Pemakaian pestisida diazinon pada tanaman sawi (*Brassica Juncea L.*) dapat meninggalkan residu yang terurai pada rentang waktu yang cukup lama, yaitu sekitar 8-35 hari (Permatasari, 2007). Residu pestisida yang dikonsumsi oleh manusia baik melalui hidung, kulit dan mulut, dapat mengikat enzim *cholinesterase*, yaitu enzim yang berfungsi mengatur kerja syaraf. Pengikatan enzim ini menimbulkan gangguan sistem saraf (Kamanyire and Karraliedde, 2004). Kuantitas residu pestisida pada tanaman ini ditentukan oleh jenis pestisida, dosis, frekuensi, dan waktu aplikasi (Afriyanto,2008). Hal lain yang mempengaruhi kuantitas residu pestisida pada tanaman adalah kondisi cuaca, suhu, dan pH lingkungan (Permatasari, 2007). Metode yang pernah digunakan untuk menganalisis residu pestisida diantaranya ekstraksi fasa padat (SPE) yang dilanjutkan dengan kromatografi gas-NPD (Garcia-Repetto, et.al, 2001, Kabir, et al., 2008). Olsson,et.al, (2003) menggunakan LC/EI tandem MS untuk menganalisis diazinon dalam urin manusia. Kromatografi cair tekanan tinggi (HPLC) juga digunakan untuk menganalisis diazinon (Mallet, 1990, Kamanyire, et.al, 2004, Abu-qare, and abu-qonia, 2001), dan penggunaan biosensor berbasis imobilisasi

(Azis, 2012). Selain HPLC dan GC, beberapa teknik kromatografi lain juga memungkinkan untuk digunakan sebagai metode analisis diazinon. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-densitometri merupakan salah satu metode pemisahan yang lebih simple dan mampu menghasilkan pemisahan yang akurat untuk senyawa-senyawa yang tidak volatil dengan konsentrasi sangat kecil (dalam satuan mikro/semimikro) (Wonorahardjo, 2013). Penggunaan KLT-densitometri untuk penentuan diazinon pada tomat menunjukkan metode ini mampu untuk mendeteksi diazinon sampai konsentrasi 0,33 ng (Rista, 2014)

METODE PENELITIAN

Bahan Kimia

Bahan kimia yang digunakan adalah pestisida organofosfat berbahan aktif diazinon 600 EC produksi PT Petrokimia Kayaku (Petrokimia Gresik Group), metanol p.a, Na₂SO₄ anhidrat, kertas saring, n-heksana p.a, etil asetat p.a, plat silika gel F254.

Bahan Sampel

Sawi hijau yang digunakan sebagai sampel ditanam menggunakan *polybag*, dan disemprot menggunakan pestisida diazinon 600 EC. Penyemprotan dilakukan pada hari ke-7 dan hari ke-28 setelah tanam. Pemanenan sampel dilakukan pada hari ke-1, 3, 5 dan 7 setelah penyemprotan kedua.

Preparasi Sampel.

Sawi hijau dipotong-potong kecil, dihaluskan menggunakan mortar. Sepuluh gram sawi hijau yang telah dihaluskan ditambahkan dengan 20 mL n-heksana dan 4,5 gram natrium sulfat anhidrat dimasukkan dalam *shaker bath* dengan kecepatan 150 rpm selama 6 jam. Larutan disaring, filtrat yang dihasilkan didistilasi vakum sampai seluruh pelarut menguap. Ditambahkan 5 mL n-heksana dalam labu alas bulat untuk melarutkan residu pada pada dinding labu.

Pemisahan Diazinon Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri

Analisis dengan kromatografi lapis tipis-densitometri menggunakan plat silika gel F₂₅₄ dengan panjang 10 cm. Bejana yang digunakan berukuran 10cmx10cmx5 cm, jarak antar totolan 1 cm, volume penotolan 40 µL menggunakan pipet mikro, eluen heksana:etil asetat dan dilakukan pada suhu ruang. Pemindaian dilakukan menggunakan Densitometer Camag 3 pada panjang gelombang 247 nm.

Penentuan Eluen Optimum

Larutan standar diazinon 4 ppm ditotolkan sebanyak 40 µL (1 µL untuk sekali totolan) pada plat KLT Silika Gel F₂₅₄. Penotolan dilakukan secara bertahap dengan proses pengeringan menggunakan *hair dryer*. Penotolan dengan jarak masing-masing titik adalah 1 cm. Plat KLT dielusi menggunakan campuran heksana:etil asetat dengan perbandingan volume 8:1; 10:1; 12:1; 14:1; 16:1; 18:1; 20:1 dan 22:1 dalam bejana (*chamber*) dengan ukuran 10 x 10 x 5 cm. Eluen didiamkan hingga batas, dikeringkan dan di pindai menggunakan densitometer untuk mengetahui nilai faktor retensi (Rf), kemurnian standart dan spot yang dihasilkan.

Pembuatan Kurva Kalibrasi

Larutan diazinon standart 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 ppm masing-masing ditotolkan sebanyak 40 µL pada plat KLT yang sudah disiapkan, dengan jarak antar totolan 1 cm. Plat selanjutnya dielusi dalam bejana sampai batas (menggunakan eluen optimum). Plat selanjutnya di keringkan pada suhu ruang dan di analisis menggunakan densitometer.

Penentuan Kadar Residu Diazinon Pada Sawi Hijau

Ekstrak diazinon yang diperoleh ditotolkan pada plat KLT F₂₅₄ dengan jarak 1 cm antar spot. Masing-masing sebanyak 40 µL, dielusi menggunakan eluen campuran heksana:etil asetat (18:1), dan diulang 3 kali untuk setiap sampel (pemanenan hari ke-1,3,5 dan 7 setelah penyemprotan terakhir).

Validasi Metode Penentuan Residu Pestisida Diazinon Pada Sawi Hijau

Persen perolehan kembali (recovery). Sejumlah 2 mL larutan 4, 5, dan 6 ppm ditambahkan kedalam sampel sawi pemanenan hari ke-7 setelah penyemprotan, dan satu sampel yang sama tanpa penambahan standart

diazinon. Sampel selanjutnya diekstrak dan ditotolkan sebanyak 40 µL setiap penotolan pada plat KLT silika gel F₂₅₄. Selanjutnya dielusi menggunakan eluen campuran heksana:etil asetat (18:1), dan dianalisis menggunakan densitometer. Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{mf - ma}{ma} \times 100\%$$

Dengan:

m_f = massa total diazinon pengukuran

m_a = massa diazinon sampel kontrol

m*_a = massa diazinon yang ditambahkan

(Harmita, 2004).

Presisi.

Larutan diazinon dengan konsentrasi 4 ppm diuji menggunakan KLT-Densitometri pada 6 titik dan di hitung standart deviasinya. Nilai standart deviasi akan menunjukkan suatu metode presisi atau tidak.

Daerah Linier.

Larutan standart diazinon 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 ppm masing-masing ditotolkan sebanyak 40 µL pada plat KLT yang sudah disiapkan, dengan jarak antar totolan 1 cm. Plat selanjutnya dielusi dalam bejana sampai batas. Plat selanjutnya dikeringkan pada suhu ruang dan dianalisis menggunakan densitometer.

Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantisasi (LOQ).

Nilai LOD dan LOQ diperoleh dari perhitungan statistik simpangan blanko. Blanko ditotolkan pada plat KLT, dielusi dan pindai dengan densitometer. Penotolan diulang sebanyak 6 kali, sehingga dapat dihitung nilai LOD dan LOQ. Persamaan LOD dan LOQ sebagai berikut:

$$LOD = \frac{3 s(\frac{y}{x})}{b} \quad LOQ = \frac{10 s(\frac{y}{x})}{b}$$

Di mana:

b = slope kurva kalibrasi

s($\frac{y}{x}$) = simpangan baku blanko (Harmita, 2004)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Eluen Optimum

Eluen merupakan salah satu komponen penting dalam pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis. Pemilihan eluen harus mendasarkan pada sifat analit yang dianalisis dan sifat dari fasa diam yang digunakan. Fase diam Plat Silika Gel F₂₄₅ bersifat polar, sehingga penggunaan fase gerak (eluen) yang bersifat polar atau semi polar dapat memperlambat laju eluen dan memungkinkan terjadinya partisi analit diantara kedua fasa. Senyawa yang bersifat polar lebih teradsorb pada fase diam dan berinteraksi dengan gaya dipol-dipol dan ikatan hidrogen, sedangkan senyawa yang bersifat non

polar akan lebih menyukai fase gerak dan berinteraksi dengan gaya london. Interaksi antara eluen, fasa diam (silika gel) dan analit dapat membentuk hubungan terner dan mempengaruhi laju analit. Hubungan ini relatif spesifik (pada kondisi tertentu) sehingga bisa digunakan sebagai analisis kualitatif suatu senyawa hasil analisis. Pada penelitian ini menggunakan campuran pelarut heksana : etil asetat yang divariasikan perbandingan konsentrasinya, dengan komposisi etil asetat tetap dan mengubah komposisi n-heksana, dengan perbandingan komposisi 8 : 1; 10 : 1; 12 : 1; 14 : 1; 16 : 1; 18 : 1; 20 : 1; dan 22 : 1. Nilai Rf yang dihasilkan dari hasil perhitungan didapatkan eluen dengan perbandingan n-heksana:etil asetat (8:1) sebesar

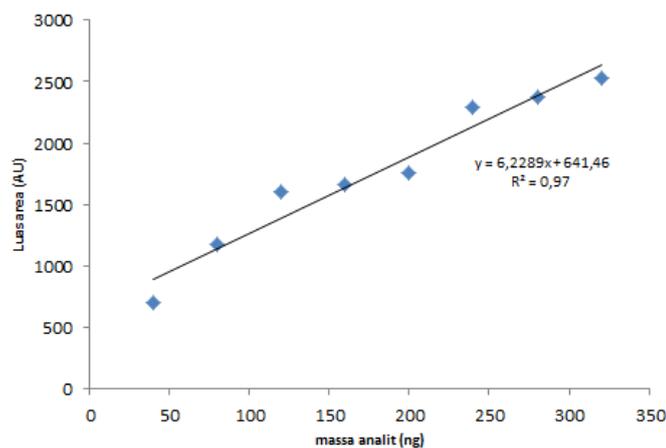
0,298±0,0035. Secara lengkap, data disajikan dalam Tabel 1.

Validasi metode

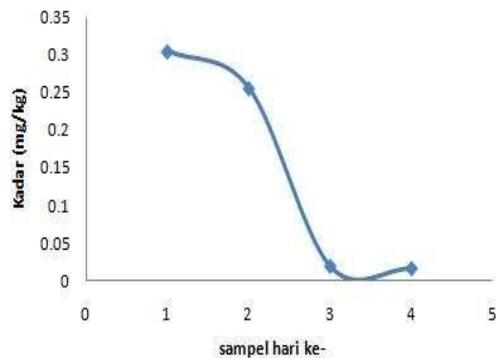
Nilai koefisien regresi diperoleh dengan menghubungkan massa analit dengan luas area hasil pengukuran pada densitometer. Nilai ini menunjukkan kemampuan suatu metode untuk dapat menghasilkan suatu hasil pengujian yang proporsional dengan konsentrasi analit pada rentang tertentu. Linieritas (R^2) yang didapatkan sebesar 0,97 (Gambar 1). Nilai ini masih lebih kecil dari nilai yang disyaratkan oleh ICH ($\geq 0,99970$) dan AOAC ($\geq 0,998$). Namun demikian, nilai ini masih berada pada rentang yang diijinkan oleh SNI, yaitu nilai $R^2 \geq 0,97$.

Tabel 1: Komposisi eluen dan nilai Rf diazinon standart

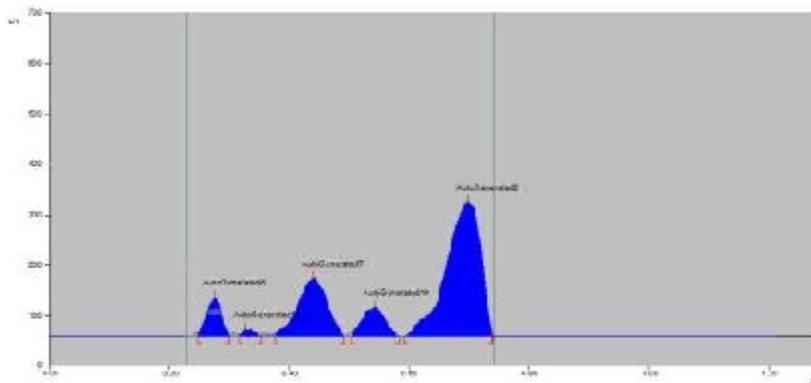
No	Komposisi Eluen (n-Heksana: etil asetat)	Rf
1	8:1	0,078±0,0035
2	10:1	0,753±0,0120
3	12:1	0,702±0,0035
4	14:1	0,693±0,0088
5	16:1	0,641±0,0060
6	18:1	0,298±0,0035
7	20:1	0,165±0,0115
8	22:1	0,410±0,0156



Gambar 1 Kurva kalibrasi diazinon



Gambar 2 Pengaruh pemanenan terhadap diazinon



Gambar 3 Densitogram ekstrak sawi hari ke-7 setelah penyemprotan

Presisi bisa ditentukan menggunakan dua cara yaitu *repeatability* dan *reproducibility*. *Repeatability* ditentukan dengan mengukur sampel pada periode tertentu, dengan kondisi yang persis sama. Nilai *repeatability* ditentukan dengan menghitung nilai simpangan baku relatif sxx(SBR). Dari 6 kali ulangan, didapatkan nilai simpangan baku relatif 0,13 (13%). Batas deteksi (LOD) dan batas kuantisasi (LOQ) keduanya menunjukkan nilai 2,21 ppm (88,44 ng) dan 6,70 ppm (268,03 ng) berturut-turut. Nilai ini menunjukkan kemampuan metode KLT-densitometri untuk menganalisis diazinon sampai pada konsentrasi sangat kecil.

Pengukuran kedekatan hasil analisis dengan nilai yang sebenarnya dicari menggunakan persen perolehan kembali atau *recovery*. *Recovery* dilakukan dengan menambahkan standart diazinon kedalam sampel yang telah diketahui konsentrasinya. Dari penambahan diazinon pada sampel didapatkan hasil perolehan kembali sebesar 100,25%, 120% dan 88,33%. Persen perolehan kembali ini mengindikasikan akurat tidaknya suatu metode, dimana rentang yang dapat diterima menurut Ermer and Miller adalah antara 80%-120%, sedangkan menurut tavernier, et.al rentang yang daat diterima adalah antara 90%-107%. Beberapa hal yang dapat mempengaruhi perolehan kembali adalah metode, konsentrasi analit dalam sampel serta kompleks tidaknya suatu metode analisis. Dari nilai yang dihasilkan, ketiganya memenuhi rentang yang disyaratkan Elmer dan Miller.

Pengaruh jarak waktu pemanenan dengan waktu penyemprotan terhadap kadar residu diazinon

Diazinon merupakan salah satu insektisida turunan organophosphat yang relatif tidak persisten di alam. Diazinon akan mengalami penguaraian menjadi bentuk turunannya atau bentuk lain yang berbeda. Waktu paruh diazinon yang relatif lama (8-35 hari), memungkinkan masih adanya residu diazinon dalam sayuran sawi hijau. Hasil pemisahan menggunakan KLT-densitometri menunjukkan kadar diazinon dalam sampel sawi hijau pada pemanenan hari ke 1, 3, 5 dan 7 setelah penyemprotan diazinon terakhir mengalami penurunan yang cukup signifikan. Secara berturut-turut masing-masing sebesar 0,305 mg/kg, 0,256 mg/kg, 0,019 mg/kg dan 0,017 mg/kg.

Penurunan kadar diazinon secara terus-menerus disebabkan oleh degradasi diazinon menjadi senyawa lain dan turunannya yang tidak dapat terdeteksi karena berada pada panjang gelombang yang berbeda dengan diazinon. Hubungan jarak waktu penyemprotan terakhir dengan waktu panen terhadap kadar diazinon dalam sampel hari ke-1 hingga sampel hari ke-4 terlihat pada Gambar 2.

Hasil densitogram ekstraks sawi hijau menunjukkan banyak senyawa lain yang terekstrak dan terdeteksi pada pemisahan menggunakan KLT dan pemindaian dengan densitometer pada 247 nm. Salah satunya seperti densitogram ekstrak sawi pada pemanenan hari ke-7 setelah penyemprotan pada gambar 3. Puncak 1 merupakan spot dari diazinon (dilihat dari nilai Rf yang dihasilkan), sedangkan

puncak lainnya diduga merupakan turunan diazinon atau senyawa lain dalam sawi hijau.

KESIMPULAN

Kromatografi Lapis tipis densitometri merupakan salah satu metode yang cukup feasible digunakan dalam menganalisis residu diazinon dalam sampel sawi hijau, beberapa parameter validasi menunjukkan nilai yang bisa diterima, namun ada parameter yang masih perlu dioptimasi lebih lanjut. Secara umum, kadar residu pestisida diazinon menunjukkan penurunan dengan penambahan rentang waktu penyemprotan dengan pemanenan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Qare, A.W., Abu-Donia, M.B., 2001, Determination of diazinone, chlorpyrifos, and their metabolites in rat plasma and urine by HPLC, *Journal of Chromatographic Science*, Vol 39: may 2001
- Afriyanto. 2008. "Kajian Keracunan Pestisida pada Petani Penyemprot Cabe di Desa Candi, Kecamatan Bandungan, Kabupaten Semarang". Tidak Diterbitkan. Tesis. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Azis, T. 2012. "Desain dan Karakterisasi Biosensor Berbasis Immobilisasi Enzim untuk Analisis Residu Pestisida Diazinon". *Paradigma*. Vol. 16 (1): 57-66.
- Garcia-Repetto, R., Gimenez, M.P., Repetto, M., 2001, New Method For Determination Of 10 Pesticides In Human Blood, *J. AOAC Int*, mar-apr; 84(2):342-9
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. 1(3): 117-135.
- Kabir KH, Rahman MA, Ahmed MS, Prodhani MDH, & Akon MW. 2008. "Determination of Residue of Diazinone and Carbosulfan in Brinjal and Quinaphos in Yard Long Bean Under Supervised Field Trial". *Bangladesh J. Agril. Res.* 33(3) : 503-513.
- Kamanyire, R., Karalliedde, L., 2004, Organophosphate toxicity and occupational exposure, *occupational medicine*, V. 54, p. 69-75
- Mallet, V.N., Duguoy, M., Bernier, M., 1990, An Evaluation of High Performance Liquid Chromatography-UV for the multi-residue analysis of organophosphorous pesticides in environmental water, *Intern. J. environmental analytical chemistry* 39: 271-279
- Olsson, A.O., Ngunyen, J.V., Sadowski, M.A., Bark, D.B., 2003, A Liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for quantification of specific organophosphorous pesticide biomarkers in human urine, *anal bioanal chem*, 376(6): 808-15 Epub 2003 Jun
- Permatasari, E.D., 2007, Bioindikator pencemaran insektisida organofosfat pada tanah pertanian, Tugas akhir, Bandung: FTSL Institut Teknologi Bandung
- Rista, M. E. 2014. "Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri untuk Analisis Residu Insektisida Diazinon dalam Buah Tomat (*Lycopersicon esculentum Mill.*)". Skripsi. Jember : Universitas Jember.
- Wonorahardjo, S. 2013. *Metode- Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta : Akademia Permata.