

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia lingkungan, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian ini akan dilakukan dalam jangka waktu 6 bulan yaitu dari bulan Februari-Agustus 2017.

4.2 Bahan dan Alat

4.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel tanah yang diambil dari Kecamatan Bumiaji, Kota Batu, Malang. Asetonitril 99% (Merck), standar diazinon pestanalTM 98,6% (Sigma-Aldrich), standar klorantraniliprol pestanal[®] 99,2% (Sigma-Aldrich), dan standar karbamat (MIPCINTA 50 WP) 50%.

4.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Genesys 10S UV-VIS spectrophotometer*, *ultrasonic cleaner (model: 008; unit size: 176 x 108 x 130 mm; tank size: 150 x 85 x 63 mm; volt: AC220-240 V 50 Hz; ultrasonic power: 50 W; frekuensi: 40 kHz); timer: 0-30 min; full capacity: 800 mL*, *magnetic stirer*, *syringe pump*, dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Shimadzu Corporation, Kyoto Japan) yang terdiri dari *prominence degassing unit (DGU-20A_{5R})*, *prominence liquid chromatography (LC-20AD)*, *prominence communication bus module (CBM-20A)*, *prominence UV/VIS detector (SPD-20AV)*, *column Lichrospher[®] 100 RP-8, 10 µm, 250 mm x 4 mm i.d.*

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Pembuatan larutan standar
 - a. Pembuatan larutan standar pestisida diazinon.
 - b. Pembuatan larutan standar pestisida karbamat.
 - c. Pembuatan larutan standar pestisida klorantraniliprol.
3. Optimasi metode
 - a) Penentuan komposisi eluen asetonitril:air yang optimum.
 - b) Penentuan laju alir yang optimum.
 - c) Penentuan panjang gelombang yang optimum.
4. Validasi metode
5. Analisis pestisida dalam sampel tanah.

4.4 Prosedur Penelitian

4.4.1 Pengambilan Sampel Tanah

Sampel tanah diambil dari lahan pertanian apel Kecamatan Bumiaji, Kota Batu. Tanah yang diambil berada pada kedalaman 0-10 cm, diayak dan disimpan dalam plastik kedap udara pada suhu ± 4 °C sampai sampel tanah akan dianalisis.

4.4.2 Ekstraksi Sampel menggunakan *Ultrasonic Solvent Extraction* (USE)

Sampel tanah ditimbang 20 g, ditambahkan dengan 60 ml asetonitril, larutan diletakkan dalam gelas beaker 100 ml. Distirer selama 1 jam dan disonikasi selama 2 menit Ekstrak disaring menggunakan kertas saring 0,2 μm . Selanjutnya dianalisis menggunakan KCKT.

4.4.3 Pembuatan Larutan Standar Pestisida

4.4.3.1 Pembuatan Larutan Standar Pestisida Diazinon

Pembuatan larutan induk standar diazinon 500 ppm dilakukan dengan memipet 45,44 μ L standar diazinon dan di masukan kedalam labu takar 100 mL. Kemudian diencerkan dengan asetonitril sampai tanda batas. Larutan diazinon dengan konsentrasi lebih rendah dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk diazinon hingga mencapai volume yang sesuai dengan menggunakan asetonitril.

4.4.3.2 Pembuatan Larutan Standar Pestisida Klorantraniliprol

Pembuatan larutan induk standar klorantraniliprol 50 ppm dilakukan dengan melarutkan padatan klorantraniliprol 0,5 g ke dalam 10 mL asetonitril Kemudian diencerkan dengan asetonitril sampai tanda batas. Larutan klorantraniliprol dengan konsentrasi lebih rendah dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk klorantraniliprol hingga mencapai volume yang sesuai dengan menggunakan asetonitril.

4.4.3.3 Pembuatan Larutan Standar Pestisida Karbamat

Pembuatan larutan induk standar karbamat 1000 ppm dilakukan dengan melarutkan padatan klorantraniliprol 1 g ke dalam 10 mL asetonitril. Kemudian diencerkan dengan asetonitril sampai tanda batas. Larutan karbamat dengan konsentrasi lebih rendah dibuat dengan cara mengencerkan larutan induk karbamat hingga mencapai volume yang sesuai dengan menggunakan asetonitril.

4.4.4 Optimasi Metode

4.4.4.1 Penentuan Komposisi Eluen Asetonitril:Air yang Optimum

Masing-masing larutan standar pestisida yang sudah dipreparasi diambil sebanyak ± 1 mL menggunakan spuit 1 cc. Selanjutnya diinjeksikan pada KCKT dengan kondisi pemisahan instrumen KCKT yaitu:

Suhu	: Suhu ruang
Kolom	: C8 250L x 4 mm
Laju alir	: 0,4 mL/min
Detektor	: UV 240 nm
Eluen	: campuran asetonitril dan air (80:20), (70:30), (60:40), (50:50), (40:60)

Selanjutnya ditentukan komposisi eluen yang optimum dari hasil pemisahan yang ditunjukkan dengan nilai R, N, k', dan α dari kromatogram-kromatogram yang terbentuk.

4.4.4.2 Penentuan Laju Alir yang Optimum

Penentuan laju alir optimum dilakukan dengan kondisi pemisahan instrumen KCKT, dengan komposisi eluen yang sudah terpilih (kondisi optimum), dengan variasi laju alir 0,2 mL/min; 0,4 mL/min; 0,6 mL/min; 0,8 mL/min; 1,0 mL/min. Selanjutnya ditentukan laju alir yang optimum dari hasil pemisahan yang ditunjukkan dengan nilai R_s , N, k', dan α dari kromatogram-kromatogram yang terbentuk.

4.4.4.3 Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Penentuan panjang gelombang optimum dilakukan dengan kondisi pemisahan instrumen KCKT, dengan komposisi eluen dan laju alir yang sudah

terpilih (kondisi optimum), dengan variasi panjang gelombang yang digunakan, yaitu 220 nm, 230 nm, 240 nm, 250 nm, 260 nm. Selanjutnya ditentukan panjang gelombang yang optimum dari hasil pemisahan yang ditunjukkan dengan nilai R_s , N , k' , dan α dari kromatogram-kromatogram yang terbentuk.

4.4.5 Validasi Metode

4.4.5.1 Linearitas

Linearitas (R^2) diperoleh dengan memploting luas puncak terhadap konsentrasi dari masing-masing standar pestisida. Untuk standar diazinon pada konsentrasi 1,0 ppm; 5,0 ppm; 10,0 ppm; 15,0 ppm; 25,0 ppm, sedangkan untuk standar klorantraniliprol pada konsentrasi 0,2 ppm; 0,5 ppm; 1,0 ppm; 2,5 ppm; 5,0 ppm.

4.4.5.2 Ketepatan

Akurasi ditentukan dari hasil pengujian *recovery* sampel yang *dispike* dengan larutan standar pestisida pada rentang konsentrasi diazinon 0,2 dan 1,0 ppm ($n = 3$) dan klorantraniliprol 1,0 dan 5 ppm ($n = 3$). % *recovery* dihitung sesuai dengan persamaan 4.1.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Konsentrasi}(S + A) - \text{Konsentrasi}(A)}{\text{Konsentrasi}(S)} \times 100 \quad (4.1)$$

Dimana:

S = standar

A = analit

Nilai *recovery* yang baik, yaitu 80 % - 100 %.

4.4.5.3 Ketelitian

Presisi ditunjukkan dengan nilai *relative standar deviation* (% RSD). Nilai RSD dapat dihitung sesuai dengan persamaan 4.3.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (4.2)$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4.3)$$

Dimana:

SD = standar deviasi
n = jumlah pengulangan
 x_i = nilai hasil yang diperoleh
 \bar{x} = konsentrasi rata-rata

4.4.5.4 *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)*

Nilai *limit of detection* (LOD) dan *limit of quantification* (LOQ) ditentukan dengan persamaan 4.4 dan 4.5.

$$LOD = 3,3(SD/S) \quad (4.4)$$

$$LOQ = 10(SD/S) \quad (4.5)$$

Dimana:

SD = standar deviasi
S = slope

4.4.6 Analisis Pestisida dari ekstrak Tanah dengan Metode *Spiking*

Untuk penentuan keberadaan sisa pestisida dalam tanah dilakukan dengan cara mengambil sampel tanah yang sudah di preparasi, disonikasi selama 300 detik kemudian diambil sebanyak ± 1 mL. Selanjutnya diinjeksikan pada KCKT melalui penyaringan dengan kertas saring mikron 0,2 μm dengan kondisi pemisahan optimum yang diperoleh sebelumnya. Selanjutnya, dilakukan perbandingan hasil kromatogram sampel tanah dengan kromatogram standar masing-masing pestisida. Apabila dalam kromatogram sampel tanah muncul kromatogram pada waktu retensi yang sama dengan waktu retensi kromatogram

standar masing-masing pestisida, maka dapat dinyatakan bahwa keberadaan sisa pestisida dalam ekstrak tanah adalah benar.

Untuk memaksimalkan hasil analisis kualitatif yang diperoleh, dilakukan metode *spiking* yaitu dengan memipet 2 mL ekstrak tanah kemudian ditambahkan larutan standar diazinon 500 ppm sebanyak 20 μ L dan larutan standar klorantraniliprol 50 ppm sebanyak 40 μ L. Selanjutnya larutan tersebut dihomogenkan dan disonikasi selama 300 detik. Setelah itu, diambil sebanyak \pm 1 mL dan diinjeksikan pada KCKT melalui penyaringan dengan kertas saring mikron 0,2 μ m, dengan kondisi pemisahan optimum yang diperoleh. Apabila muncul kromatogram dengan waktu retensi yang sama dengan standar pestisida dan tinggi puncak yang diperoleh lebih tinggi dari kromatogram sampel tanah sebelum *dispike* dengan standar pestisida, maka dapat dipastikan bahwa kromatogram dalam sampel tersebut adalah kromatogram senyawa pestisida.

Untuk memperoleh kadar sisa pestisida dalam sampel tanah, dilakukan dengan menghitung konsentrasi masing-masing residu pestisida sesuai dengan persamaan 2.5.