

Validasi Metode Penetapan Bahan Aktif Permethrin dalam Insektisida dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Hasbi Bagja Walansyah¹, Kartini Afriani^{1,*}, Agus Salim², Fareka Kholidanata¹

¹)Program Studi Analisis Kimia, Politeknik AKA Bogor, Jl. Pangeran Sogiri No.283, Bogor, 16154, Indonesia

²) PT. Agriculture Construction (Agricon), Jl. Siliwangi No.68, Bogor, 16134, Jawa Barat

Email: kartini-a@kemenperin.go.id

(Received: 26 April 2023; Accepted: 29 Juli 2023; Published: 31 Juli 2023)

Abstrak

Salah satu bahan aktif yang terkandung dalam insektisida adalah permethrin. Pengujian kadar bahan aktif permethrin dilakukan dengan menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Metode penetapan kadar bahan aktif permethrin dalam insektisida merupakan metode baru yang akan digunakan untuk analisis rutin di laboratorium. Oleh karena itu, diperlukan validasi terhadap metode tersebut terhadap beberapa parameter yang dapat menimbulkan variasi terhadap hasil pengujian dan mengidentifikasi komponen yang dapat mempengaruhi unjuk kerja metode dan mengetahui pengaruh yang ditimbulkan. Hasil parameter validasi metode uji diperoleh hasil sebagai berikut: pengujian spesifisitas terhadap standar permethrin memberikan respon *peak* pada menit ke-6 untuk trans-permethrin dan menit ke-7 untuk cis-permethrin; uji linieritas didapatkan nilai koefisien korelasi (r) 0,9995; limit deteksi instrumen (LDI) 16,99 mg/L; limit kuantitasi (LK) 56,66 mg; uji presisi *repeatability* diperoleh nilai persen simpanan baku relative (%SBR) 0,85%; uji presisi antara didapatkan nilai %SBR sebesar 1,17% untuk analis I, 0,97% untuk analis II, 1,17% untuk alat I, dan 0,92% untuk alat II. Pada parameter uji akurasi diperoleh rentang %*recovery* sebesar 98,23 – 100,34 % dan uji ketegaran terhadap perubahan suhu kolom, komposisi eluen, dan perbedaan laju alir diperoleh nilai $F_{hitung} < F_{tabel}$ dan nilai $t_{hitung} < t_{tabel}$. Metode telah memenuhi syarat keberterimaan yang mengacu pada *Collaborative International Pesticides Analytical Council. Document No. 3807* (CIPAC 3807).

Kata Kunci: Insektisida, Permethrin, CIPAC 3807

Abstract

One of the active ingredients contained in insecticides is permethrin. Testing the levels of the active ingredient permethrin was carried out using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The method of determining the concentration of the active ingredient permethrin in insecticides is a new method that is used for routine analysis in the laboratory. Therefore, it is mandatory to validate the method on several parameters that can cause variations in the test results and identify components that can affect the performance of the method and determine the effect. The results of the parameter validation of the test method obtained the following results: the specificity test for standard permethrin gave a peak response at the 6th minute for trans-permethrin and the 7th minute for cis-permethrin; linearity test obtained correlation coefficient (r) 0.9995; instrument detection limit (LDI) 16.99 mg/L; quantitation limit (LK) 56.66 mg; repeatability precision test obtained relative standard deposit percent value (% SBR) 0.85%; intermediate precision test obtained % SBR values of 1.17% for analyst I, 0.97% for analyst II, 1.17% for tool I, and 0.92% for tool II. In the parameter accuracy test, the %recovery range was 98.23 – 100.34% and the robustness test for changes in column temperature, eluent composition, and differences in flow rates obtained $F_{count} < F_{table}$ and $t_{count} < t_{table}$. The method meets the acceptance requirements referring to Collaborative International Pesticides Analytical Council. Document No. 3807 (CIPAC 3807).

Keywords: Insecticide, Permethrin, CIPAC 3807

PENDAHULUAN

Insektisida merupakan zat atau senyawa kimia yang secara umum diperunakan untuk memberantas serangga (Djojsumarto, 2008). Serangga dapat mengganggu kegiatan di berbagai

sektor seperti dalam bidang pertanian, kesehatan, industri bahkan lingkungan perumahan, sehingga sangat membutuhkan insektisida untuk mengatasi kehadiran serangga tersebut (Soenandar, 2010). Secara umum, bahan aktif yang terkandung dalam

produk insektisida antara lain adalah deltamethrin, cypermethrin, dan permethrin.

Permethrin tergolong dalam senyawa piretroid sintetis dan merupakan racun yang bekerja pada saraf melalui kontak insektisida dengan larva atau nyamuk (Suwasono, 2001). Permethrin bereaksi dengan serangga apabila termakan atau tersentuh. Permethrin mempengaruhi sistem saraf pada serangga, menyebabkan kejang otot, kelumpuhan, hingga kematian. Permethrin merupakan hasil sintesis dari tiruan *pyrethrum*, suatu senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam bunga aster *chrysanthemum*.

Pengujian kadar bahan aktif permethrin di laboratorium menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan mengacu pada farmakope eropa 2.4.24 (European Pharmacopoeia). Penelitian mengenai validasi metode terkait pengujian permethrin banyak dilakukan seperti Tian J. *et al.* (2016) memvalidasi pengujian *residual solvent* dalam permethrin. Penelitian Arayne *et al.* (2011) melakukan validasi metode menggunakan HPLC- *isocratic reversed-phase* (RP-HPLC) untuk menentukan kadar permethrin menggunakan detektor UV-vis. Sementara itu, Gracia *et al.* (2001) melakukan validasi metode uji penetapan permethrin dalam sampo dan lotion menggunakan HPLC. Pada penelitian ini dilakukan validasi penetapan kadar bahan aktif permethrin dalam insektisida menggunakan HPLC, sebagai metode baru yang akan digunakan untuk analisis permethrin di Laboratorium tempat penelitian dilakukan. Oleh karena itu diperlukan validasi terhadap metode tersebut untuk mengkonfirmasi bahwa metode telah memenuhi persyaratan.

Tujuan penelitian ini ialah untuk mengkonfirmasi bahwa metode penetapan kadar bahan aktif permethrin dalam insektisida menggunakan HPLC telah memenuhi persyaratan. Parameter yang diujikan meliputi spesifisitas, linieritas, limit deteksi instrumen (LDI), limit kuantitasi (LK), presisi *repeatability*, presisi antara, akurasi dan ketegaran metode, dengan syarat keberterimaan mengacu pada *Collaborative International Pesticides Analytical Council* (CIPAC) 3807 (CIP, A., 1999).

BAHAN DAN METODE

Validasi metode pada penelitian ini dilakukan dengan menguji parameter spesifisitas, linieritas, limit deteksi instrumen (LDI), limit kuantitasi (LK), presisi *repeatability*, presisi antara, akurasi dan ketegaran metode. Syarat keberterimaan validasi metode mengacu pada *Collaborative International Pesticides Analytical Council* (CIPAC) 3807.

Pembuatan Standar Kerja Permethrin 1000 mg/L

Standar permethrin ditimbang 10 mg dengan botol timbang dan pindahkan ke labu takar 10 mL. Standar permethrin yang telah ditimbang kemudian dilarutkan dengan metanol LC *grade* sampai setengah volume labu takar. Tahap berikutnya, larutan disonifikasi selama 5 menit untuk menghilangkan gas dan gelembung, ditera dengan metanol LC *grade* sampai tanda tera. Campuran dihomogenkan.

Pembuatan Larutan Deret Standar Permethrin

Larutan deret standar kerja permethrin dibuat dalam konsentrasi 800, 900, 1000, 1100, dan 1200 mg/L. Standar baku ditimbang sebanyak 8, 9, 10, 11, dan 12 mg ke labu takar 10 mL. Deret standar yang telah ditimbang dilarutkan dengan metanol LC *grade* hingga setengah volume labu takar dan disonifikasi selama 5 menit. Setelah itu, larutan ditera sampai tanda batas, kemudian larutan dihomogenkan.

Pembuatan Larutan Fasa Gerak

Larutan fasa gerak dibuat dari campuran metanol : akuabides (85:15, v/v). Fasa gerak dibuat dalam volume 500 mL. Sebanyak 75 mL akuabides dituangkan ke labu takar 500 mL, dan metanol ditambahkan setelahnya sampai dengan tanda batas labu takar. Fasa gerak kemudian dimasukkan ke dalam botol reagen 500 mL, selanjutnya larutan fasa gerak disonifikasi selama 10 menit untuk menghilangkan gelembung dan gas.

Preparasi Sampel Insektisida

Sampel insektisida yang disimpan pada suhu ruang ditimbang sejumlah 120 mg dan dituangkan ke labu takar 25 mL. Sampel yang sudah ditimbang, lalu dilarutkan dengan metanol LC *grade* sampai setengah volume labu takar dan disonifikasi selama 5 menit. Setelah itu, larutan ditera sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

Pengondisian Sistem *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Instrumen HPLC dikondisikan terlebih dahulu sebelum digunakan. Pengondisian alat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengkodisian HPLC

Instrumen	Shimadzu LC 20 AT
Kolom	<i>Thermohypersil</i> C-18 (150 x 4,6 mm), 5 μ m <i>particle</i>
Fasa Gerak	Metanol: Air (85:15)
Laju Alir	1 mL/menit
Detektor	UV
Panjang	272 nm
Gelombang	
Suhu Kolom	35°C

Sistem	Isokratik
Volume Injeksi	10 µm
Waktu Retensi	120 menit

Uji Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan dengan menginjeksikan larutan blanko dan larutan sampel sebanyak masing-masing satu kali ke dalam sistem HPLC. Data hasil pengujian dievaluasi dengan membandingkan kromatogram larutan blanko, larutan sampel, dan larutan standar permethrin dengan kemurnian 96,2%.

Uji Linieritas

Pada uji linieritas, larutan deret standar dengan konsentrasi 800, 900, 1000, 1100, dan 1200 mg/L, diinjeksikan pada sistem HPLC. Dari hasil luas daerah permethrin yang diperoleh, dibuat kurva linieritas terhadap konsentrasi permethrin sehingga didapatkan nilai koefisien korelasi (r), *slope*, dan *intercept* dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - (b \sum_{i=1}^n x_i)}{n} \quad (1)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{n} \right)}{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n} \right)} \quad (2)$$

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i}{n} \right)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n} \right)^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n y_i^2}{n} \right)^2}} \quad (3)$$

Keterangan:

- a: *intercept* (luas area)
- b: *slope* (luas area/konsentrasi)
- r: koefisien korelasi
- x_i : Nilai konsentrasi standar ulangan ke-i (mg/L)
- y_i : Luas area ulangan ke-i (abs)
- n: Banyaknya ulangan i: 1, 2, 3, ..., n

Menurut Meier dan Zund (2000), kadar bahan aktif permethrin dalam insektisida dapat dihitung menggunakan rumus (4) dan (5).

$$\text{Kadar permethrin} = \frac{\text{Luas Area} - \text{Intercept}}{\text{Slope}} \quad (4)$$

$$y = ax + b \quad (5)$$

Keterangan:

- y: luas area permethrin
- a: *intercept*
- b: *slope*

Uji Limit Deteksi dan Kuantisasi

Uji limit deteksi instrumen (LDI) dan limit kuantisasi (LK) dilakukan dengan menghitung konsentrasi secara teoritis melalui regresi linier dari hasil uji parameter linieritas menggunakan rumus sebagai berikut:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_c)^2}{n-2}} \quad (6)$$

$$\text{LDI} = \frac{3 \times S_{y/x}}{b} \quad (7)$$

$$\text{LK} = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (8)$$

Keterangan:

- B: *slope* (luas area/konsentrasi)
- $S_{y/x}$: simpangan baku (mg/L)
- Y_i : nilai pengukuran luas area
- Y_c : nilai perhitungan luas area dengan persamaan
- n: banyaknya pengulangan, i: 1, 2, 3, ..., n

Uji Presisi Repeatability

Uji presisi *repeatability* dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar permethrin, larutan sampel *technical*, dan larutan sampel insektisida yang sudah dipersiapkan. Penimbangan dilakukan sebanyak 8 kali ulangan dan diinjeksikan masing-masing sebanyak 1 kali pada sistem HPLC. Data hasil pengujian dievaluasi dengan menghitung nilai simpangan baku relatif (%SBR) menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (9)$$

$$\text{SB} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i - \bar{x}}{n-1}} \quad (10)$$

$$\% \text{SBR} = \frac{\text{SB}}{\bar{x}} \times 100\% \quad (11)$$

Keterangan:

- \bar{x} : konsentrasi rata-rata sampel (mg/L)
- x_i : konsentrasi sampel ulangan ke-i (mg/L)
- n: banyaknya ulangan
- i: 1, 2, 3, ..., n
- SB: simpangan baku konsentrasi sampel (mg/L)
- %SBR: simpangan baku relatif (%)

Uji Presisi Antara

Pada uji presisi antara, larutan sampel yang sudah dipersiapkan, diinjeksikan. Penimbangan dilakukan sebanyak 8 kali ulangan dan diinjeksikan masing-masing sebanyak satu kali pada sistem HPLC. Pengujian dilakukan oleh analis yang berbeda dan alat yang berbeda pada hari yang berbeda. Data hasil pengujian dievaluasi dengan menghitung %SBR dan menghitung uji distribusi F dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$F_{\text{hitung}} = \frac{\text{SB besar}^2}{\text{SB kecil}^2} \quad (12)$$

$$F_{\text{tabel}} = (db_1, db_2, \alpha) \quad (13)$$

$$\alpha = 5\%$$

Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan cara sampel ditambahkan larutan induk permethrin (konsentrasi 1000 mg/L) sebanyak 2,00 ml pada konsentrasi rendah, 4,00 ml pada konsentrasi sedang, dan 6,00 ml pada konsentrasi tinggi, diinjeksikan pada sistem HPLC. Preparasi dilakukan 3 kali pada masing – masing variasi konsentrasi. Data hasil pengujian dievaluasi dengan menghitung persen perolehan kembali (%*recovery*) menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{C_3 - C_1}{C_2} \times 100\% \quad (14)$$

Keterangan:

%*recovery*: perolehan kembali konsentrasi permethrin dalam sampel formulasi (%)

C₁: konsentrasi permethrin dalam sampel (mg/L)

C₂: konsentrasi *spike* permethrin yang ditambahkan (mg/L)

C₃: konsentrasi permethrin dalam sampel + *spike* permethrin yang ditambahkan (mg/L)

Uji Ketegaran Metode

Uji ketegaran metode dilakukan dengan mengukur larutan sampel yang ditimbang sebanyak 5 kali pengulangan dan diinjeksikan masing – masing satu kali ke dalam sistem kromatografi cair kinerja tinggi. Kondisi penginjeksikan ke dalam sistem HPLC divariasikan terhadap kondisi normal yaitu dengan mengubah laju alir (0,8 dan 1,2 mL/menit), suhu kolom (30°C dan 25°C) dan komposisi fasa gerak metanol : akuabides (82:18 dan 88:12). Data hasil pengujian dievaluasi dengan menghitung uji F dan uji t. Uji t dapat dilakukan dengan rumus (15-17).

$$S^2 = \frac{(n_1 - 1) SB_1^2 + (n_2 - 1) SB_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad (15)$$

$$t_{\text{hitung}} = \left| \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \right| \quad (16)$$

$$t_{\text{tabel}} = (df_1 + df_2 - 2) \quad (17)$$

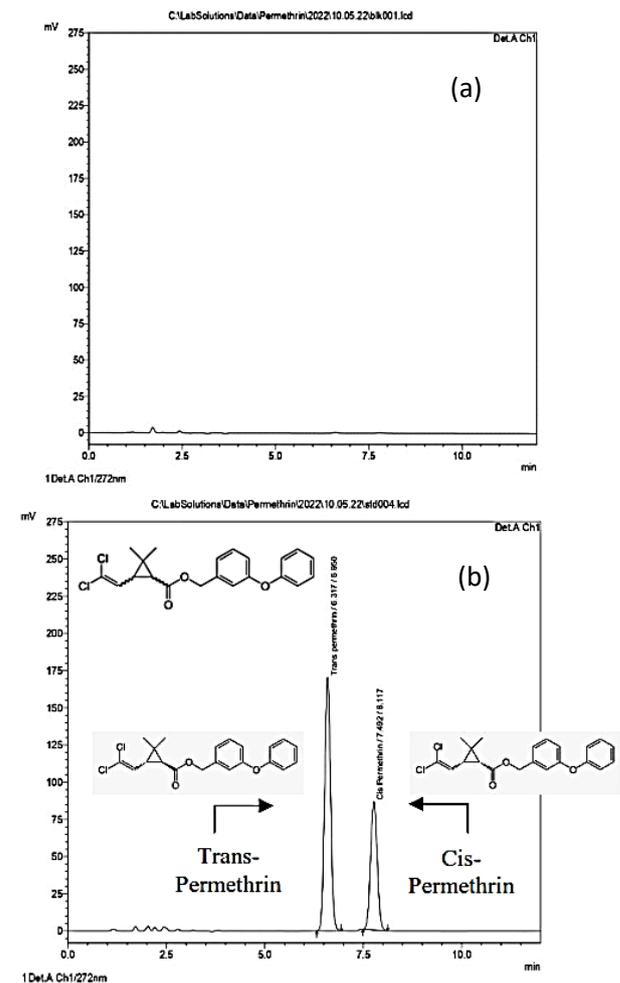
$$\alpha = 5\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Sensitifitas

Uji spesifisitas metode dilakukan untuk mengidentifikasi zat secara akurat dan cermat dengan adanya komponen lain dalam matriks (Harmita, 2004). Spesifisitas digunakan untuk melihat waktu retensi sampel. Hal ini dilakukan untuk melihat apakah ada serapan ketika menginjeksikan sampel tanpa analit kemudian dibandingkan dengan dengan sampel yang

mengandung analit dan atau standar. Hasil uji spesifisitas dinyatakan pada Gambar 1 (a) dan (b).

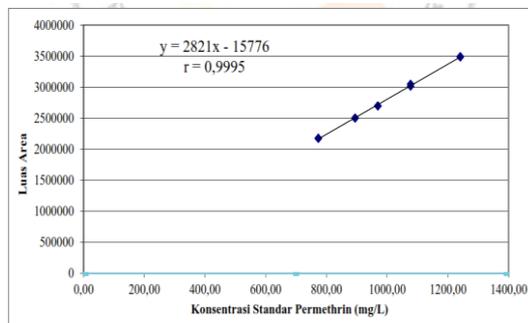


Gambar 1. Kromatogram (a) Blanko Permethrin, (b) Standar Permethrin 1000 mg/L

Berdasarkan hasil pengujian (Gambar 1 (a)), blanko pelarut yaitu metanol LC *grade* tidak memberikan respon pada menit ke-6 dan ke-7. Sedangkan pada Gambar 1(b), dapat dilihat standar permethrin 1000 mg/L memberikan respon yang dapat dibuktikan dengan munculnya puncak kromatogram pada menit ke-6 untuk trans-permethrin dan menit ke-7 untuk cis-permethrin. Berdasarkan hasil analisis kuantitatif perbandingan antara kromatogram sampel dengan kromatogram blanko pelarut dimana tidak adanya analit pengganggu yang muncul pada target sehingga hal ini menginformasikan bahwa pengujian kadar bahan aktif permethrin dalam sampel insektisida secara HPLC bersifat spesifik. Afshar *et al.* (2013) mendapatkan peak trans dan cis permethrin pada menit ke-16,2 dan 20,3 berturut-turut dengan menggunakan fase gerak etanol : asam fosfat pH 3 (67:33, v/v). Sementara Garcia *et al.* (2001) mendapatkan peak pada menit ke-13 dan 17 untuk trans dan cis permethrin dengan fasa gerak metanol : air (78:22, v/v).

Uji Linieritas

Uji linieritas ditetapkan menggunakan deret larutan standar minimal empat konsentrasi dengan rentang berbeda yang mengandung 50-150% kadar analit per sampel.



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Deret Standar Permethrin

Hubungan linieritas ini dapat terlihat dari koefisien korelasi (r) pada persamaan regresi ($y = bx + a$, dengan b sebagai *slope* dan a sebagai *intercept*). Hasil pengukuran disajikan dalam kurva kalibrasi deret standar permethrin yang dapat dilihat pada Gambar 2. Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 2821x - 15776$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9995, dengan nilai *intercept* sebesar -15776 menyatakan bahwa saat konsentrasi permethrin 0,0000 mg/L maka nilai luas areanya ialah -15776. Nilai *slope* sebesar 2821 artinya saat konsentrasi permethrin bertambah satu satuan, maka nilai luas areanya meningkat sebesar 2821 kali. Nilai koefisien korelasi dari deret standar permethrin menunjukkan respon positif dan linier terhadap konsentrasi yang telah ditentukan. Nilai

yang didapatkan telah memenuhi syarat yang mengacu pada CIPAC 3807 yaitu $r \geq 0,99$. Hasil ini juga sejalan dengan penelitian Garcia *et al.* (2001) yang mendapatkan persen korelasi sebesar 0.9999.

Uji Limit Deteksi Instrumen dan Limit Kuantitasi

Limit deteksi instrumen (LDI) ialah batas terkecil dari konsentrasi analit yang masih terbaca alat. LDI untuk mengetahui konsentrasi analit terendah yang masih dapat dideteksi oleh alat yang digunakan. Limit kuantitasi (LK) untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima. Nilai LK menunjukkan nilai yang dipercaya menunjukkan konsentrasi analit yang terkuantitasi dan dapat terbaca oleh alat (Riyanto, 2014). Berdasarkan hasil pengujian didapatkan nilai LDI sebesar 16,99 mg/L dan nilai LK sebesar 56,66 mg/L. Hasil ini juga sesuai dengan hasil perhitungan teoritis yang sudah dilakukan.

Uji Presisi Repeatability

Presisi *repeatability* merupakan kedekatan pengukuran hasil uji yang dilakukan secara berulang oleh analisis yang sama, pada kondisi yang sama, dan dalam waktu interval yang pendek (Riyanto, 2014). Uji presisi *repeatability* dilakukan dengan menginjeksi larutan sampel insektisida, larutan sampel *technical* permethrin dan larutan standar permethrin sebanyak masing – masing sebanyak delapan kali. Hasil uji presisi *repeatability* standar permethrin ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengujian Presisi *Repeatability* Standar dan Sampel Permethrin

No	Total Area Standar	Total Area Sampel	Konsentrasi Sampel (mg/L)	Kemurnian (mg/L)	No	Bobot penimbangan standar (mg) in 10 mL	Konsentrasi (mg/L)	Total Luas Area Standar	Konsentrasi Presisi (mg/L)
1	2828081	3744536	22,7856	215,9618	1	10,0	962,0	2828081	1008,10
2	2828141	3672339	22,6296	214,4838	2	10,0	962,0	2828141	1008,12
3	2871811	3196539	22,1969	210,3820	3	10,0	962,0	2871811	1023,60
4	2865004	3220075	22,3949	212,2586	4	10,0	962,0	2865004	1021,19
5	2866484	3212672	22,3318	211,6613	5	10,0	962,0	2866484	1021,72
6	2891617	3207957	22,1236	209,6874	6	10,0	962,0	2891617	1030,62
7	2892528	3206545	22,1620	210,0516	7	10,0	962,0	2892528	1030,95
8	2861936	3274464	22,8354	216,4338	8	10,0	962,0	2861936	1020,10
Rata – Rata				212,6150	Rata – rata				1020,55
SB				2,68	SB				8,70
%SBR				1,26	% SBR				0,85
0,67 %CV Horwitz				4,78	0,67 %CV Horwitz				3,78

Berdasarkan Tabel 2, nilai rata – rata total standar area permethrin pengujian sebesar 2863200, dengan nilai %SBR sebesar 0,85%. Hasil tersebut memenuhi persyaratan yang ditetapkan laboratorium yang mengacu pada CIPAC 3807 yaitu nilai %SBR < 0,67 x CV Horwitz (3,78%).

Hasil pengujian presisi *repeatability* sampel insektisida (Tabel 2) didapatkan nilai rata – rata kadar sampel insektisida pengujian sebesar 212,62 mg/L, dengan nilai %SBR sebesar 1,26%. Hasil tersebut memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh laboratorium yang mengacu pada

CIPAC 3807 yaitu nilai %SBR < 0,67 x CV Horwitz (4,78%).

Hasil pengujian presisi *repeatability* sampel *technical* permethrin (Tabel 3), didapatkan nilai rata – rata kadar sampel insektisida pengujian sebesar 900,70 mg/L, dengan nilai %SBR sebesar 1,14%. Hasil tersebut memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh laboratorium yang mengacu pada

CIPAC 3807 yaitu %SBR < 0.67 x CV Horwitz (3,85%). Menurut (Sumardi, 2002), nilai SBR 1% < SBR < 2% menyatakan tingkat ketelitian tinggi terhadap data pengujian. Penelitian ini sejalan dengan yang telah diperoleh sebelumnya oleh Garcia *et al.* (2001) mendapatkan presisi instrumentasi pada rentang 0,22–1,81%, dan presisi *repeatability* pada rentang 0,2–2,39%.

Tabel 3. Hasil pengujian presisi *repeatability* sampel *technical* permethrin

No	Total Area Standar	Total Area Sampel	Konsentrasi Sampel (mg/L)	Kemurnian (mg/L)
1	2912552	2893699	95,58	905,8816
2	2944396	2984586	93,76	888,6819
3	2944396	2994579	94,81	898,5694
4	2944396	3007927	95,23	902,5747
5	2944396	2935182	96,28	912,5806
6	2948724	3049890	96,60	915,5975
7	2942897	2959244	93,92	890,1440
8	2942897	2958211	94,07	891,5645
Rata – Rata				900,70
SB				10,26
%SBR				1,14
0,67 %CV Horwitz				3,85

Uji Presisi Antara

Uji presisi antara dilakukan untuk mengevaluasi kinerja antara analisis dan antara alat kromatografi cair kinerja tinggi. Uji presisi antara analisis dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan sampel insektisida sebanyak delapan kali pengulangan oleh analisis yang berbeda pada

peralatan yang sama. Sementara untuk uji presisi antara alat dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan sampel insektisida sebanyak delapan kali pengulangan oleh analisis yang sama pada peralatan yang berbeda. Hasil uji presisi antara diberikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengujian presisi antara

Ulangan	Konsentrasi Sampel Insektisida (mg/L)		Konsentrasi Sampel Insektisida (mg/L)	
	Analisis I	Analisis II	Alat I	Alat II
1	215,96	211,74	215,96	216,60
2	214,48	211,74	214,48	214,07
3	210,38	210,99	210,38	214,17
4	212,26	208,81	212,26	218,33
5	211,66	211,54	211,66	213,52
6	215,37	216,25	215,37	212,30
7	209,69	212,64	209,69	212,98
8	210,05	212,05	210,05	214,53
Rata -rata	212,48	211,97	212,48	214,56
SD	2,49	2,07	2,49	1,98
% SBR	1,17	0,97	1,17	0,92
Uji-F	F_{hitung} = 1,44 < F_{tabel} = 3,79 Tidak Berbeda Nyata		F_{hitung} = 1,58 < F_{tabel} = 3,79 Tidak Berbeda Nyata	

Berdasarkan Tabel 4, didapatkan nilai %SBR sebesar 1,17% untuk analisis I, 0,97% untuk analisis II, 1,17% untuk alat I, dan 0,92% untuk alat II. Hasil tersebut memenuhi persyaratan yang ditetapkan dengan syarat keberterimaan nilai %SBR < 0,67 x CV Horwitz (1,68%). Pada perhitungan statistika pada presisi antara analisis dan presisi antara alat diperoleh $F_{hitung} < F_{tabel}$.

Hasil uji statistika menyatakan bahwa metode penetapan kadar permethrin dalam insektisida dapat dilakukan oleh analisis berbeda dan

alat berbeda, serta dapat dilakukan dalam hari berbeda karena sama – sama memberikan hasil yang optimal. Sementara pada penelitian Garcia *et al.* (2001) didapatkan presisi antara pada rentang 0,44–1,87%. Penelitian yang dilakukan sejalan dengan penelitian lainnya.

Uji Akurasi

Akurasi, dapat dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (%*recovery*), merupakan suatu nilai yang menunjukkan kedekatan hasil analisis

dengan nilai sebenarnya (Harmita, 2004). Pada penetapan akurasi dilakukan penambahan bahan aktif secara tiga kali pada tiga variasi konsentrasi, yaitu level bawah, tengah dan atas sebanyak 2 ml, 4

ml, dan 6 mL untuk masing – masing variasi konsentrasi. Hasil uji ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Pengujian Akurasi

Level Konsentrasi	Luas Area Campuran (Adisi standar dalam sampel)	C Terukur Campuran (mg/L)	C spike Campuran (mg/L)	%recovery
Bawah 80 %	2196359	780,29	777,612	100,34
	2257551	801,40	810,167	98,92
	2299342	815,83	814,818	100,12
Tengah 100 %	2634502	931,49	948,297	98,23
	2722411	961,82	964,575	99,71
	2730376	964,57	966,900	99,76
Atas 120 %	3337815	1174,20	1172,466	100,15
	3355645	1180,35	1174,792	100,47
	3284523	1155,81	1156,189	99,97

Tabel 5 menunjukkan hasil percobaan %recovery yang diperoleh memiliki nilai yang berbeda. Hasil uji akurasi tersebut masuk ke dalam rentang %recovery yang dipersyaratkan yaitu 98-102%. Pada hasil uji parameter akurasi tersebut menunjukkan bahwa metode pengujian ini memberikan kedekatan hasil analisis dengan nilai sebenarnya. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Garcia *et al.* (2001) dengan nilai %recovery secara statistic tidak jauh dari 100%.

Uji Ketegaran Metode

Uji ketegaran metode dilakukan untuk mengetahui pengaruh yang diberikan kepada metode mempengaruhi hasil analisis atau tidak. (Riyanto, 2014). Pada penelitian, perubahan kondisi analisis yang diujikan yaitu dengan memvariasikan suhu kolom 25°C dan 30°C), laju alir (1,2 mL/menit; 0,8 mL/menit), dan komposisi eluen pengujian metanol: air (82:18 dan 88:12) terhadap kondisi normal yaitu suhu kolom (35°C),

laju alir (1,0 mL/menit) dan komposisi eluen metanol : akuabides (85:15). Evaluasi dilakukan dengan membandingkan hasil pengukuran pada variasi yang ditetapkan dengan hasil pengukuran pada kondisi normal. Kemudian diuji ketepatannya dengan uji F. Hasil pengujian ketegaran metode terdapat pada Tabel 6. Berdasarkan Tabel 6, hasil pengujian terhadap perubahan suhu kolom, komposisi eluen, dan perbedaan laju alir diperoleh nilai $F_{hitung} < F_{tabel}$ dan nilai $t_{hitung} < t_{tabel}$. Hal ini menunjukkan ragam konsentrasi terukur sampel insektisida pada masing – masing variasi tidak berbeda nyata dengan kondisi normal. Hal ini menginformasikan bahwa metode validasi penetapan kadar permethrin dalam sampel insektisida secara HPLC dapat mempertahankan unjuk kerjanya dengan baik secara presisi dan akurat.

Tabel 6. Hasil Pengujian Ketegaran Metode

Variasi	Ulangan	Konsentrasi Terukur		Uji F		Uji t	
		Variasi	Normal	F _{hitung}	F _{tabel}	t _{hitung}	t _{tabel}
Laju Alir 0,8 mL/ menit	1	222,68	223,38	1,59	6,39	1,16	2,31
	2	220,48	221,30				
	3	222,88	216,77				
	4	225,12	221,64				
	5	220,49	220,46				
Laju Alir 1,2 mL/ menit	1	221,05	223,38	2,43	6,39	0,85	2,31
	2	220,07	221,30				
	3	216,95	216,77				
	4	220,28	221,64				
	5	219,69	220,46				
Suhu Kolom 25°C	1	215,14	223,38	1,46	6,39	0,98	2,31
	2	218,85	221,30				
	3	217,40	216,77				
	4	221,19	221,64				
	5	222,55	220,46				
Suhu Kolom 30°C	1	215,76	223,38	1,18	6,39	1,25	2,31
	2	218,38	221,30				
	3	217,97	216,77				
	4	220,93	221,64				
	5	221,18	220,46				
Komposisi Eluen Metanol : Air (88:12)	1	215,07	223,38	1,14	6,39	2,04	2,31
	2	219,56	221,30				
	3	215,03	216,77				
	4	216,82	221,64				
	5	220,76	220,46				
Komposisi Eluen Metanol : Air (82:18)	1	218,80	223,38	2,32	6,39	2,12	2,31
	2	218,91	221,30				
	3	216,60	216,77				
	4	215,87	221,64				
	5	219,53	220,46				
Kesimpulan				F_{hitung} ≤ F_{tabel}, maka metode Tidak Berbeda Nyata		t_{hitung} ≤ t_{tabel}, maka metode Tidak Berbeda Nyata	

KESIMPULAN

Hasil penelitian diperoleh simpulan bahwa seluruh parameter validasi metode uji penetapan kadar bahan aktif permethrin dalam insektisida menggunakan HPLC telah memenuhi syarat keberterimaan yang telah ditetapkan oleh laboratorium yang mengacu pada CIPAC 3807 dengan koefisien korelasi (r), 0,999 untuk uji linieritas; dan dengan %SBR < 0,67 x CV Horwitz untuk uji limit deteksi instrumen (LDI), limit kuantitasi (LK), uji presisi *repeatability*, presisi antara, akurasi, dan ketegaran metode. Metode ini dinyatakan valid dan dapat digunakan untuk analisis rutin di laboratorium. Penelitian lanjutan dapat dilakukan pada aspek validasi penetapan trans dan cis permethrin secara terpisah dengan menggunakan HPLC.

DAFTAR PUSTAKA

- Afshar, M., Salkhordeh, N., & Rajabi, M. (2013). An ecofriendly and stability indicating HPLC method for determination of permethrin isomers: application to pharmaceutical analysis. *Journal of Chemistry*, 2013.
- Arayne, M. S., Sultana, N., & Hussain, F. (2011). Validated RP-HPLC method for determination of permethrin in bulk and topical preparations using UV-vis detector. *Journal of chromatographic science*, 49(4), 287-291.
- CIP, A. (1999). *Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulations*. Collaborative International Pesticides Analytical Council. Document No. 3807.
- Council of Europe (Strasbourg), Convention on the elaboration of a European pharmacopoeia, Council of Europe. European Department for the Quality of Medicines, Europarat, European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, & European Pharmacopoeia Commission. (2010). *European Pharmacopoeia*: Published in Accordance with the Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia (European Treaty Series No. 50) (No. 50). Council of Europe.
- Djojosumarto, P. (2008). *Panduan lengkap pestisida & aplikasinya*. Agromedia.
- Garcia, E., Garcia, A., & Barbas, C. (2001). Validated HPLC method for quantifying permethrin in pharmaceutical formulations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5-6), 999-1004.
- Harmita, H. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3), 1.
- Meier, P. C., & Zünd, R. E. (2005). *Statistical methods in analytical chemistry*. John Wiley & Sons.

- Riyanto, P. D. (2014). *Validasi & Verifikasi Metode Uji Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. DEEPUBLISH.
- Soenandar, M., Raharjo, A., & Aeni, M. N. (2010). *Petunjuk Praktis Membuat Pestisida Organik*. AgroMedia.