

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan dengan tempat serta kegiatan penelitian sebagai berikut:

1. Laboratorium Riset Kimia Makanan untuk tahapan penyiapan larutan, ekstraksi, fotodegradasi dengan UV-C pada 3 jenis seduhan (teh putih, hijau, dan hitam) yang telah ditambahkan larutan standar pestisida buprofezin serta pengujian aktivitas antioksidan.
2. Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI untuk analisis residu pestisida buprofezin dalam 3 jenis seduhan (teh putih, hijau, dan hitam).

3.2. Alat

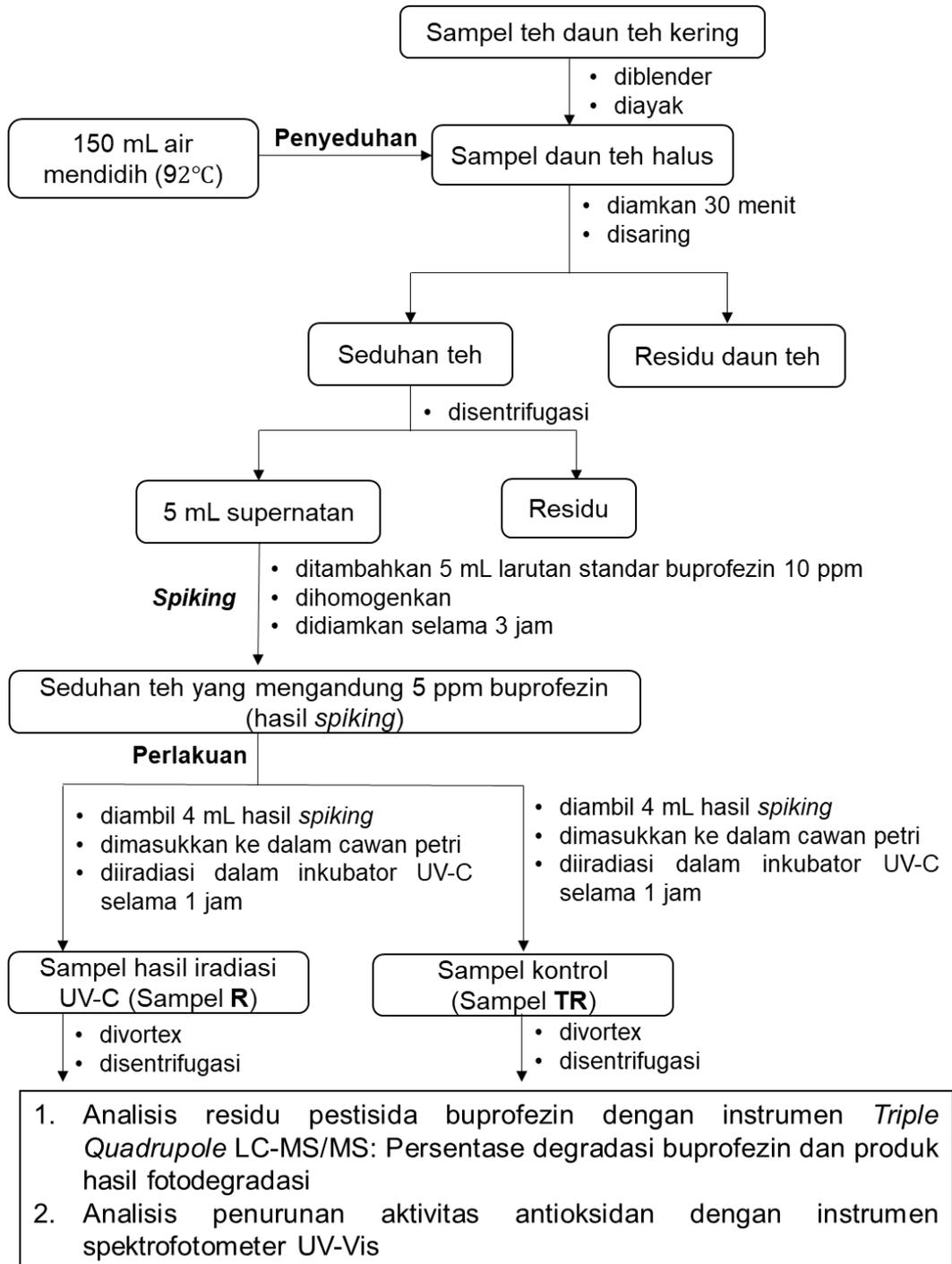
Pada penelitian ini digunakan beberapa peralatan yaitu alat-alat gelas (Gelas kimia, gelas ukur, cawan petri, botol vial, pipet tetes, batang pengaduk, labu ukur), gelas keramik, mikropipet, spatula, neraca analitik, termometer, panci listrik, inkubator UV-C dengan lampu UV 15 W (Yang) dan sentrifugasi tipe H-103n. Instrument yang digunakan untuk analisis residu pestisida buprofezin pada seduhan teh yaitu LC-MS/MS *Triple Quadrupole* (Tipe LCMS-8045 Shimadzu). Instrumen yang digunakan untuk menguji antioksidan pada seduhan teh dengan dan tanpa perlakuan iradiasi UV-C yaitu spektrofotometer UV-Vis (tipe UV mini 1240, Shimadzu).

3.3. Bahan

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah teh putih, hijau dan hitam diperoleh dari PPTK (Pusat Penelitian Teh dan Kina) Gambung, larutan stok standar buprofezin (99%) 1009,8 ppm dengan volume 5 mL diperoleh dari Laboratorium Kimia Agro-Cikole Lembang, aquades, kertas saring Whatman no. 42, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) merk HIMedia Laboratories Pvt. Ltd., metanol *grade* AR (99,8%) (Fulltime®), *water grade* LC-MS (LiChrosolv®), asam format *grade* LC-MS (Emsure®), asetonitril *grade* LC-MS (Fulltime®), alumunium foil dan plastik *wrap*.

3.4. Bagan Alir Penelitian

Tahapan proses dalam penelitian memodifikasi dari penelitian Dai dkk., 2021; Lu dkk., 2022; dan Zheng dkk., 2023 dengan beberapa variasi dan digambarkan dalam diagram alir sebagai berikut (**Gambar 3.1**):



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.5. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan diantaranya sebagai berikut:

3.5.1. Preparasi Larutan Standar Dari Larutan Stok

Pembuatan larutan standar buprofezin dilakukan dengan mengambil sejumlah larutan stok, dengan perhitungan berdasarkan persamaan (1) sebagai berikut:

$$[C]Standar = \frac{V\ stok \times [C]stok}{V\ standar} \quad (1)$$

Keterangan:

$[C]Standar$: Konsentrasi larutan standar (mg/L)

$[C]Stok$: Konsentrasi larutan stok (mg/L)

$V\ Standar$: Volume larutan standar (mL)

$V\ Stok$: Volume larutan stok (mL)

(Perhitungan dapat dilihat di **Lampiran 1**).

3.5.2. Preparasi Pembuatan Seduhan Teh Putih, Hijau, dan Hitam

Preparasi pembuatan seduhan teh merujuk pada jurnal Lu dkk. (2022) dan Zheng dkk. (2023) dengan beberapa modifikasi. Pada penelitian ini sampel teh putih, hijau dan hitam diambil 0,5 gram masing-masing, diblender dan diayak dengan saringan 14 mesh kemudian diekstraksi dengan menambahkan 150 mL air mendidih (92°C) selama 30 menit, kemudian didinginkan pada suhu ruang. Ekstrak sampel yang sudah dingin dilakukan proses dekantasi, penyaringan dengan kertas saring Whatman No. 42 dan diambil filtratnya (seduhan teh putih, hijau, dan hitam) (Perhitungan dapat dilihat di **Lampiran 5**).

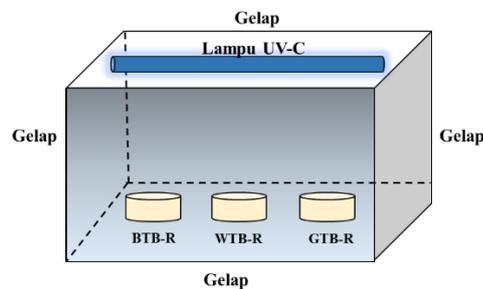
3.5.3. Preparasi *Spike* Seduhan Teh

Preparasi *spike* seduhan teh dengan pestisida buprofezin merujuk pada penelitian Dai dkk. (2021) dan Lu dkk. (2022) dengan beberapa modifikasi. Filtrat hasil pembuatan seduhan teh disentrifugasi selama 10 menit 3000 rpm (sentrifugasi tipe H-103n). Sebanyak 5 mL supernatan masing-masing jenis seduhan teh ditambahkan (*spike*) ke dalam larutan standar pestisida buprofezin konsentrasi 10 ppm sebanyak 5 mL di labu ukur 10 mL dan selanjutnya dihomogenkan kemudian diinkubasi selama 3 jam, sehingga di dalam seduhan teh mengandung 5 ppm buprofezin. Seduhan teh hasil *spike* diberi perlakuan gelap (ditutupi alumunium voil

dan tanpa iradiasi) dan iradiasi UV-C selama 1 jam. (Perhitungan dapat dilihat di **Lampiran 5**). Berikut ini merupakan kode sampel seduhan teh yang telah di spike: teh putih (WTB), teh hijau (GTB), dan teh hitam (BTB).

3.5.4. Tahapan Fotolisis Seduhan Teh Hasil *Spike* Dengan Pestisida Buprofezin

Tahapan fotolisis seduhan teh hasil *spike* merujuk pada penelitian Tikekar dkk. (2014) dan Zheng dkk. (2023) dengan beberapa modifikasi. Seduhan teh putih, hijau, dan hitam yang telah di *spike* dengan pestisida buprofezin diambil 4 mL ke dalam cawan petri tanpa tutup selanjutnya diiradiasi dengan inkubator UV-C selama 1 jam (**Gambar 3.2**) dan dibuat duplo tiap perlakuan. Lalu, diambil 1 mL sampel dan diberi perlakuan gelap (ditutupi aluminium foil dan tanpa iradiasi).



Gambar 3.2 Skema Diagram Iradiasi Seduhan Teh dengan UV-C

Berikut ini merupakan keterangan dari **Gambar 3.2** yaitu BTB-R (Seduhan teh hitam dengan radiasi), WTB-R (Seduhan teh putih dengan radiasi), dan GTB-R (Seduhan teh hijau dengan radiasi). Kode sampel tanpa iradiasi (TR) dan sampel dengan iradiasi (R).

3.5.5. Tahapan Analisis LC-MS/MS

Tahapan analisis LC-MS/MS mengacu pada penelitian Mu dkk., (2023) dengan beberapa kondisi yang disesuaikan dengan alat. Referensi ion induk dan ion produk (m/z) spesifik senyawa buprofezin mengacu dari penelitian Majumder dkk., (2022). Berikut ini merupakan kondisi analisis yang diterapkan dalam penelitian ini (**Tabel 3.1**).

Tabel 3.1 Kondisi Analisis LC-MS/MS Buprofezin

Senyawa yang akan dianalisis	Buprofezin
Instrumen	LC-MS/MS tipe <i>Triple Quadrupole</i> LCMS-8045 Shimadzu, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan
Kolom	Shim-pack GIST-HP C ₁₈ (4,6×50mm)

Collision gases	Helium
Suhu kolom dan interface	40°C dan 300°C
Tekanan, laju alir, dan electrospray voltage nebulizer	15,0 psi, 2,70 L/menit, dan +4000 V
Mode ionisasi	<i>Electrospray ion source positive</i> (ESI +)
Fase Gerak	A (100% asetonitril) dan B (0,1% asam format dalam <i>ultrapure water</i>)
Elusi Gradien	Elusi gradien dioptimalkan pada 0,40 mL/menit sebagai berikut: 0–0,2 menit 20% A 0,2–2 menit dari 60% A 2–6 menit 80% A 6–7 menit 80% A 7–7,01 menit 20% A 7,0–10 menit 20% A
Mode Analisis	<i>Multi-reaction monitoring</i> (MRM)
Volume injeksi	10 μ L
Pasangan ion kuantifikasi (m/z)	306,15/200,9
Pasangan ion identifikasi (m/z)	306,15/116,1 306,15/57,15

Pada tahapan ini, ditentukan pengukuran beberapa konsentrasi larutan standar untuk memperoleh persamaan regresi ($y = mx + b$) dengan nilai (slope) dan b (intersep), yang akan digunakan dalam perhitungan penentuan residu buprofezin dalam sampel. Ditentukan juga batas deteksi (LOD) dan batas deteksi kuantisasi (LOQ) larutan standar buprofezin dalam instrumen LC-MS/MS *Triple Quadrupole*. Berikut ini persamaan yang digunakan untuk perhitungan LOD dan LOQ (persamaan 2a, b, dan c).

$$LOD = \frac{3 \times Sb}{b} \quad (2a)$$

$$LOQ = \frac{10 \times Sb}{b} \quad (2b)$$

$$Sb = \sqrt{\frac{\sum (y - y')^2}{n - 2}} \quad (2c)$$

Keterangan:

Sb : Simpangan baku residual

b : Kemiringan garis/ *slope* (Garis linear dari kurva kalibrasi)

Pada penelitian ini juga dilakukan penentuan presisi dan akurasi metode LC-MS/MS yang digunakan dengan analisis menggunakan sampel tanpa perlakuan iradiasi UV-C (sampel TR), dengan hasil yang diperoleh berupa persen perolehan

kembali (%*recovery*) untuk akurasi dan standar deviasi relatif (%RSD). Berikut ini persamaan yang digunakan untuk perhitungan persen perolehan kembali (%*recovery*) untuk akurasi dan standar deviasi relatif (%RSD).

$$\%RSD = \frac{\text{Standar deviasi}}{\text{Rata-rata}} \times 100\% \quad (3a)$$

$$\%Recovery = \frac{C_A}{C_r} \times 100\% \quad (3b)$$

Keterangan:

C_A : Konsentrasi analit mula-mula

C_r : Konsentrasi analit yang terdeteksi

3.5.6. Penentuan Persentase Degradasi Pestisida Buprofezin

Pada penelitian ini penentuan persentase degradasi pestisida buprofezin setelah iradiasi UV-C diperoleh dari hasil analisis dengan instrumen LC-MS/MS *Triple Quadrupole*. Rumus perhitungan persentase degradasi diperoleh dari Widihati dkk. (2011), dengan persamaan (4) sebagai berikut:

$$\% \text{ Degradasi Buprofezin} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100\% \quad (4)$$

Keterangan:

C_0 : Konsentrasi awal pestisida buprofezin (sebelum iradiasi UV-C atau sampel TR)

C_t : Konsentrasi pestisida buprofezin pada waktu (t) tertentu (setelah iradiasi UV C atau sampel R)

3.5.7. Uji Antioksidan Dengan DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan merujuk pada penelitian Sami & Rahimah (2016) dengan beberapa modifikasi. Larutan DPPH dibuat dengan melarutkan sejumlah DPPH dalam metanol *grade* p.a. Seduhan teh dengan dan tanpa iradiasi UV-C diuji aktivitas antioksidannya dengan membuat larutan blanko, kontrol dan sampel.

Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan mencampurkan 2 mL seduhan teh (masing-masing sampel TR dan R) dengan larutan 3 mL DPPH 0,1 mM. Larutan blanko adalah pelarut metanol *grade* AR. Sedangkan untuk larutan kontrol dibuat dengan mencampurkan 2 mL pelarut metanol *grade* AR dengan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM. Masing-masing campuran dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap. Pengukuran absorbansi dilakukan dengan menggunakan

spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm. Aktivitas antioksidan dapat dihitung berdasarkan persamaan (5) sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan } (\%AA) = \left(\frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Keterangan:

Abs Kontrol : absorbansi DPPH

Abs Sampel : absorbansi DPPH yang ditambahkan seduhan teh

Kemudian, untuk mengetahui adanya pengaruh aktivitas antioksidan pada sampel seduhan teh dengan perlakuan iradiasi UV-C dan tanpa iradiasi maka dihitung persentase penurunan aktivitas antioksidan, berdasarkan persamaan (6) sebagai berikut:

$$\% \text{ Penurunan Aktivitas Antioksidan } = \left(\frac{\%AATR - \%AAR}{\%AATR} \right) \times 100 \quad (6)$$

Keterangan:

%Aktivitas Antioksidan TR (%AATR): Persentase aktivitas antioksidan di seduhan teh hasil *spike* tanpa iradiasi UV-C (TR).

% Aktivitas Antioksidan R (%AAR) : Persentase aktivitas antioksidan di seduhan teh hasil *spike* dengan iradiasi UV-C (R).