

BAB III

METODE PENELITIAN

1.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama 6 bulan di Laboratorium Riset Kimia Makanan Departemen Pendidikan Kimia UPI dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia UPI.

1.2 Alat dan Bahan

Berikut merupakan alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kotak yang dilengkapi dengan lampu UV-C 15 W di bagian penutupnya, neraca analitik (Mettler Toledo tipe ME204), termometer, panci listrik, blender, mikropipet ukuran 1000-5000 μL (DragonLab), sentrifugasi (H-103n, Kokusan, Jepang), mikrosentrifugasi (Boeco tipe M-24A), sonikator (Labocon), vorteks *shaker* (Scilogex tipe MX-S) dan instrumen yang digunakan adalah UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS (Shimadzu LCMS-8045, Shimadzu, Tokyo, Jepang) serta Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV mini-1240, Jepang). Selain itu, digunakan pula alat-alat kaca seperti gelas kimia berukuran 100, 250, dan 400 mL, batang pengaduk, spatula, corong, labu ukur berukuran 50, 25, 10, dan 5 mL, ayakan berukuran 20 *mesh*, gelas ukur 250 mL, tabung eppendorf 1,5 mL, tabung falcon ukuran 15 dan 50 mL, botol vial 10 mL serta *micro insert* 250 μL .

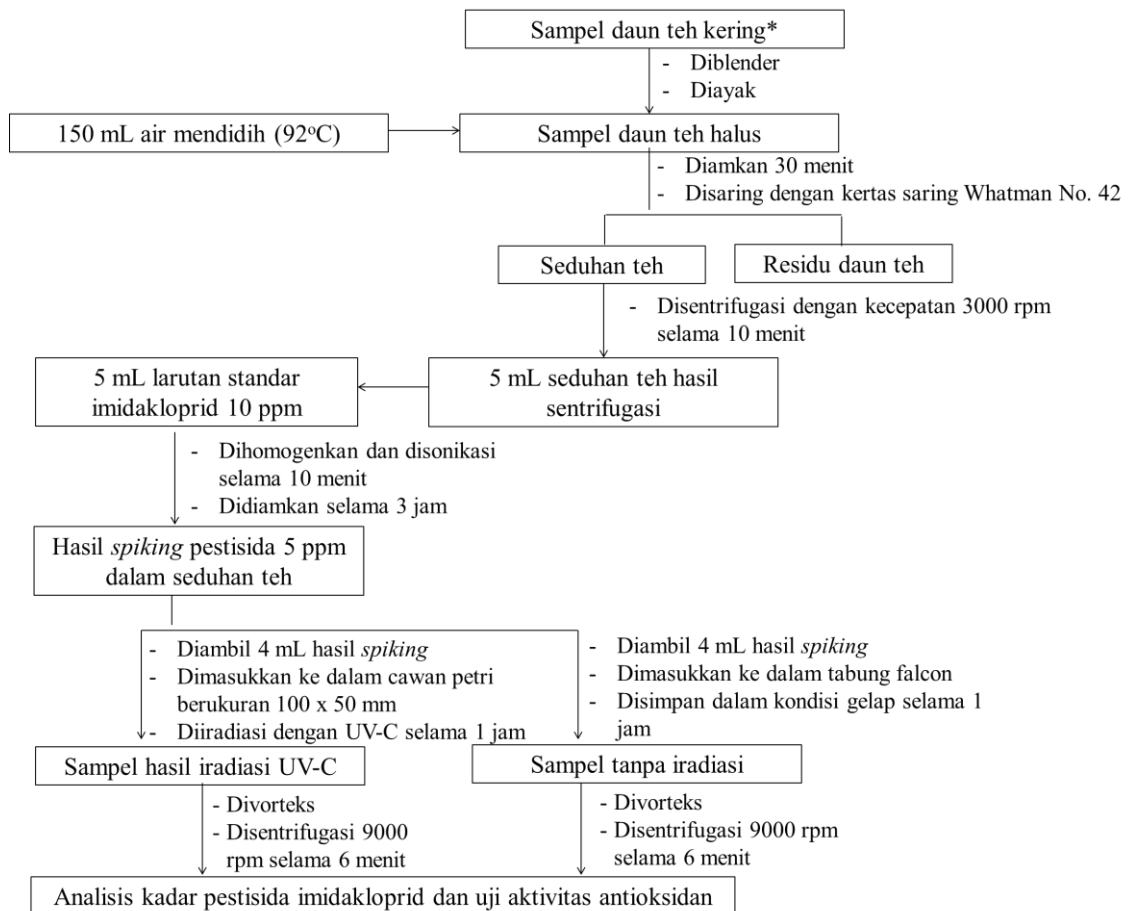
3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi teh hijau, teh putih, teh hitam yang diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung, larutan stok pestisida imidakloprid (99,7%) 997 ppm yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Agro Lembang, akuades *grade* LCMS (LiChrosolv®), asetonitril *grade* LCMS (Fulltime®), asam format *grade* LCMS (Emsure®), metanol AR *grade* (99,8%) (Fulltime®), kertas saring Whatman No. 42, 2,2-*diphenyl*-1-*picrylhydrazine* (DPPH) (HIMedia Laboratories Pvt. Ltd.), dan aluminium foil. Sebelum proses pemetikan dan pengolahan, tanaman teh yang digunakan untuk

analisis telah diberikan pestisida, seperti imidakloprid sebanyak 0,4 g/ 4 ha dan deltametrin sebanyak 0,5 L/ 5 ha.

1.3 Bagan Alir Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan tiga jenis teh, yaitu teh hijau, teh putih, dan teh hitam. Adapun langkah-langkah yang dilakukan pada penelitian ini ditunjukkan pada bagan alir penelitian dalam **Gambar 3.1**.



*daun teh hijau kering, daun teh hitam kering, dan daun teh putih kering

Gambar 3. 1 Bagan Alir Penelitian

1.4 Tahapan Penelitian

Terdapat beberapa tahapan dalam penelitian yang dilakukan, meliputi

3.4.1 Penyiapan Larutan Standar

Larutan standar dibuat dengan mengencerkan larutan stok pestisida imidakloprid 1000 mg/L dalam asetonitril menjadi 10 mg/L dan disimpan dalam botol vial untuk analisis selanjutnya pada tahap *spiking*.

3.4.2 Pembuatan Kurva Standar

Kurva standar dibuat dengan mengencerkan larutan stok pestisida imidakloprid 1000 mg/L dalam asetonitril menjadi 0,1; 0,5; 1; dan 5 mg/L dan disimpan dalam botol vial untuk kemudian analisis kurva standar menggunakan UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS.

3.4.3 Penyiapan Seduhan Teh

Penyiapan seduhan teh dilakukan melalui beberapa tahapan, di antaranya

3.4.3.1 Pembuatan Serbuk Daun Teh

Daun teh ditimbang sebanyak ± 11 gram kemudian dihaluskan dengan blender. Setelah diblender, daun teh diayak dengan ayakan berukuran 20 *mesh* hingga didapatkan serbuk daun teh sebanyak ± 10 gram untuk selanjutnya digunakan pada langkah penyeduhan teh.

3.4.3.2 Penyeduhan Teh

Metode preparasi dan *spiking* diadaptasi dari Zheng et al. (2023). Sebanyak 0,5 gram sampel teh hijau yang telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam gelas keramik dan diseduh dengan 150 mL air mendidih (92 °C) selama 30 menit. Setelah 30 menit penyeduhan, seduhan teh kemudian disaring dengan kertas saring Whatman No. 42 sambil didinginkan. Hasil penyaringan kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Langkah ini diulangi untuk penyiapan seduhan teh putih dan teh hitam.

3.4.4 *Spiking* dengan Pestisida Imidakloprid

Sebanyak 5 mL larutan standar imidakloprid 10 ppm ditambahkan ke dalam 5 mL seduhan teh yang telah disentrifugasi. Larutan kemudian disonikasi selama 10 menit dan didiamkan selama 3 jam untuk kemudian masuk ke percobaan fotodegradasi menggunakan iradiasi UV-C.

3.4.5 Percobaan Fotodegradasi dengan UV-C

Sebanyak 4 mL sampel seduhan teh hasil *spiking* dengan larutan pestisida imidakloprid dimasukkan ke dalam cawan petri berukuran 100×50 mm dan disimpan dalam kotak yang di bagian penutupnya sudah dipasang lampu UV-C 15 W sebagai sumber UV. Iradiasi dilakukan selama 60 menit untuk setiap

percobaan. Percobaan iradiasi dilakukan sebanyak 2 kali. Metode fotodegradasi diadaptasi dari Zheng et al. (2023). Untuk sampel tanpa iradiasi, penyimpanan seduhan teh hasil *spiking* dilakukan di dalam tempat dengan kondisi gelap.

3.4.6 Analisis dengan UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS

Pada tahap ini, dilakukan optimasi sebelum analisis kandungan imidakloprid. Optimasi yang pertama dilakukan adalah optimasi deteksi massa. Pada tahap ini, analisis dilakukan dengan menggunakan mode ionisasi ESI+ dan mode analisis *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Fasa gerak yang digunakan adalah 100% asetonitril *grade* LCMS sebagai fasa gerak A dan air yang diasamkan dengan asam format 0,1%. Optimasi deteksi massa ini dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar imidakloprid 10 ppm ke dalam instrumen. Pada tahap ini, diketahui m/z dari ion prekursor dan ion produk.

Tahap optimasi selanjutnya adalah optimasi sistem kromatografi. Pada tahap ini, metode analisis diadaptasi dari H. Mu et al. (2023) dengan sedikit perubahan dengan kondisi analisis menggunakan UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS yang ditunjukkan pada **Tabel 3.1**. Pada tahap ini, diketahui waktu retensi dari senyawa imidakloprid. Setelah diketahui waktu retensi, kemudian dilakukan penentuan kurva standar. Penentuan kurva standar dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1; dan 5 ppm yang telah dibuat pada tahap sebelumnya hingga didapatkan kurva standar yang memuat nilai regresi (R^2) dan persamaan linear untuk penentuan kadar imidakloprid dalam seduhan teh. Kurva standar juga dapat digunakan dalam penentuan nilai *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ).

Sebelum dilakukan analisis penentuan kadar imidakloprid dalam seduhan teh dengan UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS, sampel terlebih dahulu divorteks dan disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 6 menit. Hasil supernatan kemudian diinjeksikan untuk selanjutnya dilakukan analisis persentase penurunan kandungan pestisida imidakloprid.

Rumus %penurunan ditunjukkan pada Persamaan 3.1. Persamaan didasarkan pada penelitian Widihati et al. (2011).

$$\text{persentase degradasi (\%D)} = \frac{C_o - C_t}{C_o} \times 100\% \quad (3.1)$$

Keterangan:

C_o = konsentrasi awal sebelum iradiasi

C_t = konsentrasi akhir setelah iradiasi

Tabel 3. 1 Kondisi analisis UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS

LC-MS/MS	UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS; Shimadzu LCMS-8045 , Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan
Kolom	Shim-pack GIST-HP C ₁₈ (4,6 × 50 mm, 3µm)
Suhu kolom	40°C
Fasa gerak	Eluen A : 100% asetonitril Eluen B : air mengandung asam format 0,1%
Mode	<i>Multiple reaction monitoring</i> (MRM)
<i>m/z</i>	Prekursor ion : 256,15 Produk ion : 208,85; 175,05; dan 210,15
Mode ionisasi	ESI+
Elusi gradien dioptimalkan pada laju alir 0,4 mL/menit sebagai berikut: 0–0,2 menit 20% A, 0,2–2 menit dari 20% hingga 60% A, 2–6 menit 80% A, 6–6,5 menit dari 80% hingga 20% A, 6,5–10 menit 20% A	
Volume injeksi	10 µL
Waktu retensi	3,243 menit

Selain perhitungan penurunan kadar imidaklopid, dilakukan pula analisis struktur senyawa hasil iradiasi UV-C pada seduhan teh hijau dengan menggunakan mode PIS (*Product Ion Scan*). Analisis ini dilakukan dengan memasukkan nilai *m/z* prekursor 211 untuk senyawa imidaklopid desnitro, *m/z* 212 untuk senyawa imidaklopid urea, dan *m/z* 227 untuk senyawa 3-((6-kloropiridin-3-il)metil)-2-iminoimidazolidin-1-ol sebagai senyawa yang terbentuk akibat iradiasi UV-C sesuai dengan penelitian Zheng et al. (2023). Setelah dimasukkan nilai *m/z* prekursor, kemudian dilihat ion produk dari masing-masing senyawa untuk mengkonfirmasi keberadaan senyawa tersebut dalam sampel seduhan teh hijau yang telah ditambahkan imidaklopid dan diiradiasi UV-C.

3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pada penelitian ini, uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dilakukan melalui penentuan persen inhibisi, baik sampel tanpa maupun dengan iradiasi UV-C. Adapun tahapan untuk penentuan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH terbagi menjadi beberapa langkah, di antaranya

3.4.7.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

Sebanyak 0,0039 gram padatan DPPH ditimbang dan kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. Selanjutnya, larutan DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang telah dilapisi aluminium foil dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan DPPH 0,1 mM dimasukkan ke dalam botol gelap dan disimpan dalam kulkas.

3.4.7.2 Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan melalui penentuan persen inhibisi. Persen inhibisi dianggap sebagai penghambatan radikal bebas yang dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH. Sebanyak 2 mL sampel seduhan teh hasil *spiking* dengan pestisida imidakloprid dengan dan tanpa iradiasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL larutan DPPH 0,1 mM. Sampel kemudian dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruangan dan kondisi gelap selama 30 menit. Absorbansi sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis (UV mini-1240) pada panjang gelombang 515 nm. Absorbansi kontrol diperoleh dari pengukuran 3 mL larutan DPPH 0,1 mM yang ditambahkan ke dalam 2 mL metanol p.a. Untuk blanko yang digunakan adalah metanol p.a. Besarnya nilai persen inhibisi atau persen penghambatan dihitung menggunakan persamaan 3.2.

$$\text{inhibisi (\%)} = \left(\frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.kontrol}} \right) \times 100\% \quad (3.2)$$

Keterangan:

Abs. Kontrol = absorbansi DPPH yang ditambahkan ke dalam metanol

Abs. Sampel = absorbansi DPPH yang ditambahkan ke dalam sampel hasil *spiking*