

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian akan dilakukan selama 5 bulan, yaitu pada bulan Maret sampai dengan bulan Juli 2024 dengan tempat dan rincian kegiatan sebagai berikut:

- a. Laboratorium Riset Kimia Makanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI) untuk melakukan preparasi sampel dan larutan standar pestisida sipermetrin, *spiking* pestisida sipermetrin, ekstraksi cair-cair dan SPE dengan QuEChERS, dan fotodegradasi radiasi UV-B pada teh hijau dan teh hitam.
- b. Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia FPMIPA UPI untuk melakukan analisis larutan standar pestisida sipermetrin dan fotodegrasi hasil radiasi UV-B dalam seduhan teh hijau dan teh hitam yang telah di *spiking* pestisida sipermetrin menggunakan instrumentasi *Gas Chromatography Flame Ionization Detector* (GC-FID).

3.2. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *chopper* (Kris), saringan 80 mesh, kaca arloji, spatula, neraca analitik (Mettler Toledo ME204), hotplate, termometer, statif dan klem, gelas kimia (100 mL; 250 mL; dan 400 mL), gelas ukur (250 mL), labu ukur (5 mL; 10 mL; dan 50 mL), batang pengaduk, corong kaca, tabung falcon 15 mL dan 50 mL (Nest), vortex (Scigolex MX-S), sentrifuge (Kokusan H-103N), mikropipet 1000-5000 μ L (Dragon Lab), mikropipet 100-1000 μ L (Eppendorf), *white tip* mikropipet 10000 μ L (MF Lab), *blue tip* mikropipet 1000 μ L, lemari pendingin (GEA freezer Royal- Kincool), cawan petri pelastik, tabung reaksi 15 mL (Iwaki dan Pyrex), rak tabung reaksi, dan *container* yang dilengkapi dengan lampu UV-B Nomoy T8 15 W 2,5 x 45 cm dibagian penutupnya, botol vial 2 mL, dan instrumentasi GC-FID (Shimadzu GC-2010).

3.3.2. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini ialah teh hijau dan teh hitam (*Camellia sinensis*) yang diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina Gambung, larutan stok pestisida Sipermetrin 1000 ppm yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Agro Lembang, larutan stok pestisida Sipermetrin 1509,36 ppm yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Agro Jakarta, akuades, aseton p.a, etil asetat, kertas saring Whatman No. 12, dan aluminium foil.

Elisa Fitri, 2024

EFEKTIVITAS RADIASI UV-B TERHADAP PENURUNAN KADAR SIPERMETRIN PADA SEDUHAN TEH HIJAU DAN TEH HITAM (*Camellia sinensis*)

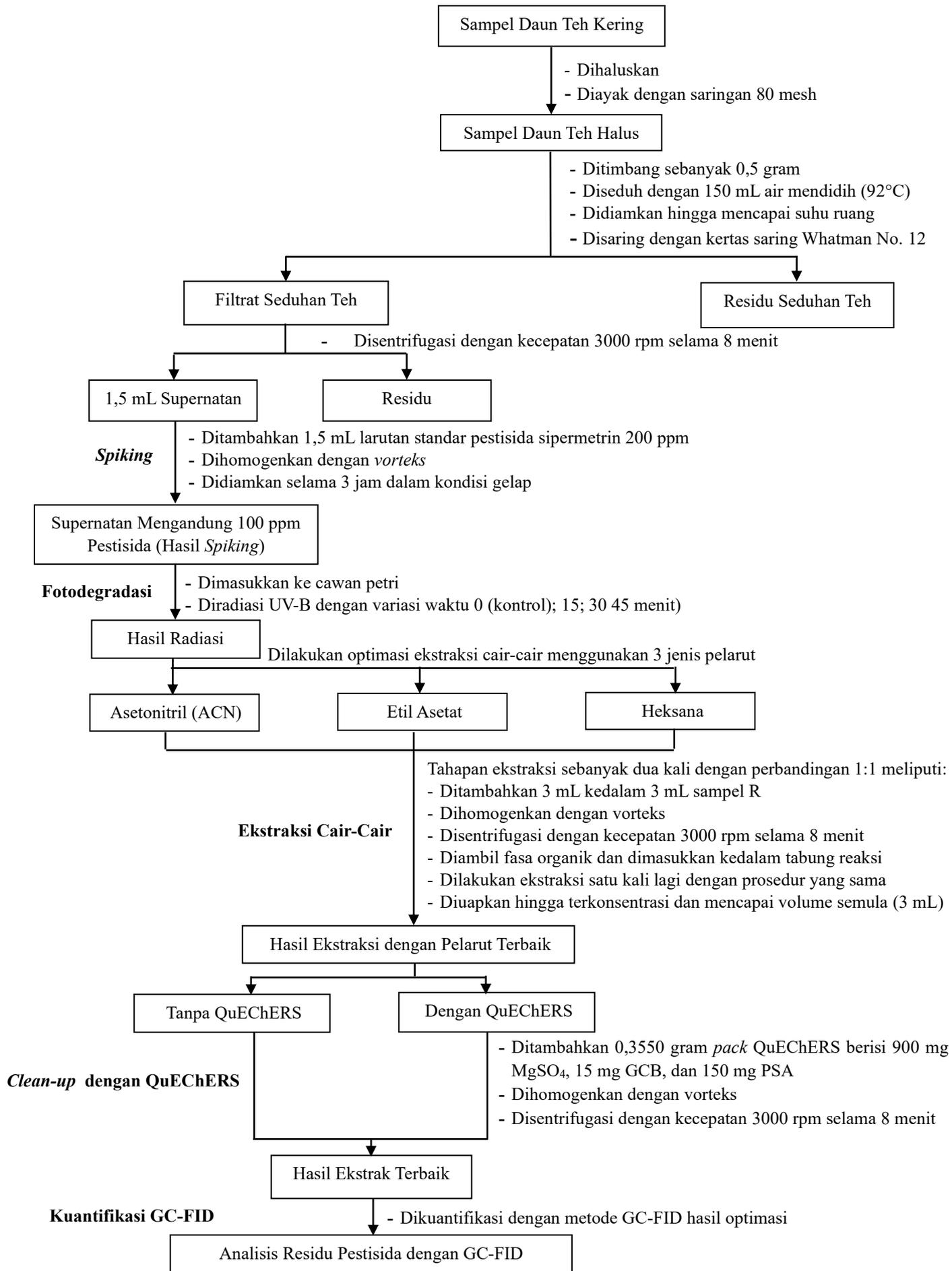
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.3. Tahapan Penelitian

Metode yang akan digunakan dalam penelitian ini diadopsi dari hasil penelitian sebelumnya dengan modifikasi beberapa bahan, metode, dan instrumen menyesuaikan tujuan penelitian yang dilakukan. Prosedur kerja pada penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan diantaranya preparasi sampel, *spiking* sipermetrin, radiasi UV-B, ekstraksi dengan etil asetat, ekstraksi fasa padat dengan QuEChERS, serta analisis kandungan sipermetrin dengan GC-FID.

Penelitian diawali dengan pembuatan seduhan teh meliputi daun teh halus hasil penghalusan dengan *chopper* dan disaring menggunakan saringan 80 mesh ditimbang sebanyak 0,5 gram untuk diseduh dengan 150 mL air mendidih (92°C) dan didiamkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah, dingin disaring dengan kertas saring Whattman No.12 untuk diambil filtrat seduhan teh. Filtrat seduhan teh di *spiking* dengan larutan pestisida sipermetrin 200 ppm sehingga didapatkan konsentrasi akhir 100 ppm. Seduhan teh yang telah terkontaminasi sipermetrin didiamkan selama 3 jam dalam kondisi gelap. Hasil *spiking* dilakukan fotodegradasi dengan radiasi UV-B variasi waktu selama 0; 15; 30; dan 45 menit. Kemudian, dilakukan ekstraksi sebanyak dua kali dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 karena etil asetat merupakan pelarut paling optimal dari tahapan optimasi ekstraksi sebelumnya.

Hasil ekstraksi cair-cair tersebut selanjutnya dioptimasi kembali dengan atau tanpa ekstraksi fase padat menggunakan QuEChERS. Tahapan ekstraksi dengan QuEChERS dilakukan dengan diambil sebanyak 2 mL hasil ekstraksi cair-cair dan ditambahkan kedalam QuEChERS berisi 900 mg MgSO₄, 15 mg GCB, dan 150 mg PSA dan divorteks serta disentrifugasi untuk diambil supernatannya. Hasilnya menunjukkan ekstrak hasil ekstraksi dengan QuEChERS lebih baik dibandingkan tanpa QuEChERS karena menghasilkan ekstrak yang lebih jernih dan tidak berwarna dibandingkan sebelumnya berupa larutan keruh dan sedikit kekuningan. Hasil ekstraksi inilah yang akan dianalisis menggunakan GC-FID dengan sampel yang akan dianalisis meliputi ekstrak seduhan teh hijau maupun teh hitam hasil *spiking* dengan radiasi UV-B selama 0; 15; 30; dan 45 menit serta seduhan teh hijau dan teh hitam tanpa *spiking* (*No Spike*) sebagai pembanding atau kontrol sehingga dapat dibandingkan tingkat degradasi yang terjadi. Bagan alir penelitian dapat diamati pada **Gambar 3.1** berikut:



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Preparasi Larutan Standar dan Kurva Kalibrasi Standar

Preparasi larutan standar dilakukan dengan dua tahapan yaitu preparasi larutan stok standar dan pembuatan kurva standar pestisida sipermetrin.

3.4.1.1. Preparasi Larutan Stok Standar Pestisida Sipermetrin

Preparasi larutan standar pestisida sipermetrin dibuat dengan mengencerkan larutan stok pestisida sipermetrin konsentrasi 1509,36 ppm dalam pelarut aseton p.a hingga konsentrasi mencapai 200 ppm sebanyak 50 mL dengan menggunakan pelarut aseton. Diketahui bahwa, sipermetrin sangat larut dalam pelarut organik diantaranya sebesar >450 g/L dalam aseton, kloroform, sikloheksana, dan xilen; 337 g/L dalam etanol; 103 g/L dalam heksana; dan sangat larut dalam etil asetat sebesar >2000 g/L serta secara spesifik sebesar >250 g/L larut dalam etil asetat untuk α -sipermetrin tetapi memiliki kelarutan rendah dalam air sekitar 0.004 mg/L (Brisbane, 2008; Examiner & Levy, 2009). Hasil pengenceran tersebut disimpan dalam botol vial untuk digunakan dalam analisis selanjutnya pada tahapan pembuatan kurva kalibrasi maupun *spiking*.

3.4.1.2. Pembuatan Kurva Standar Pestisida Sipermetrin

Pembuatan larutan standar pestisida Sipermetrin untuk pembuatan kurva standar dilakukan dengan mengencerkan larutan pestisida Sipermetrin 200 ppm menggunakan pelarut aseton p.a menjadi beberapa konsentrasi tertentu yaitu 0; 30; 60; 90; dan 120 ppm. Deret standar konsentrasi yang dibuat mencakup rentang konsentrasi disesuaikan dengan tujuan analisis (Nisah & Nadhifa, 2020). Hasil pengenceran disimpan dalam botol vial untuk kemudian dilakukan analisis kurva standar menggunakan instrumen GC-FID. Pada tahap ini, diketahui waktu retensi dari senyawa pestisida Sipermetrin. Setelah diketahui waktu retensi, kemudian dilakukan penentuan kurva standar.

Berdasarkan kurva standar dihasilkan persamaan regresi $y = ax + b$ dan koefisien determinasi atau nilai regresi. Persamaan linear digunakan untuk penentuan kadar sipermetrin dalam sampel teh dan nilai regresi digunakan untuk mengetahui linieritas pengukuran sampel dengan nilai koefisien determinasi mendekati 1 atau nilai $R^2 > 0,997$ (Handayani dkk., 2018b). Kurva standar juga dapat digunakan dalam penentuan nilai *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ) dari senyawa pestisida sipermetrin.

3.4.2. Preparasi Sampel Teh (*Camellia sinensis*)

Preparasi sampel teh (*Camellia sinensis*) dalam bentuk teh kering terdiri dari teh hijau dan teh hitam yang diperoleh dari Pusat Penelitian Teh dan Kina (PPTK) Gambung. Tahapan preparasi sampel teh meliputi pembuatan serbuk teh, penyeduhan teh, dan *spiking* pestisida sipermetrin.

3.4.2.1. Pembuatan Serbuk Teh (*Camellia sinensis*)

Preparasi pembuatan serbuk daun teh didasarkan pada penelitian sebelumnya yang merujuk pada penelitian Lu dkk., (2022) dan Zheng dkk., (2023), sampel daun teh hijau dan teh hitam masing-masing dihaluskan dengan *chopper*. Untuk mendapatkan hasil serbuk teh dengan maksimal, setelah dihaluskan disaring dengan saringan berukuran 80 mesh hingga didapatkan serbuk daun teh untuk digunakan pada tahapan selanjutnya yaitu penyeduhan teh.

3.4.2.2. Penyeduhan Teh (*Camellia sinensis*)

Metode penyeduhan teh diadopsi dari penelitian sebelumnya yang merujuk pada penelitian Lu dkk., (2022), penyeduhan teh dilakukan dengan menimbang serbuk daun teh hijau dan teh hitam halus masing-masing sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan kedalam gelas kimia berukuran 400 mL. Kemudian, masing-masing serbuk daun teh diseduh dengan 150 mL air panas dengan suhu 92°C dan diaduk. Seduhan teh tersebut didiamkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah dingin, seduhan teh disaring dengan kertas saring Whatman No. 12 dan ditampung masing-masing jenis filtrat dalam labu erlenmeyer untuk dipindahkan kedalam tabung falcon 50 mL berbeda. Didasarkan pada penelitian H. Chen dkk., (2014) dengan modifikasi, filtrat hasil filtrasi seduhan teh di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 8 menit dan diambil supernatan yang dihasilkan untuk digunakan pada tahapan berikutnya.

3.4.2.3. *Spiking* Pestisida Sipermetrin

Spiking merupakan penambahan zat analit dalam hal ini pestisida sipermetrin kedalam sampel agar degradasi kandungan sipermetrin dalam sampel dapat teramati dengan jelas. Metode *spiking* diadopsi dari penelitian sebelumnya dengan merujuk pada penelitian (Dai dkk., 2021; Zheng dkk., 2023), *spiking* pestisida sipermetrin dilakukan dengan menambahkan 1,5 mL larutan standar pestisida sipermetrin 200 ppm kedalam 1,5 mL supernatan hasil sentrifugasi seduhan teh hijau dan teh hitam masing-masing. Campuran tersebut kemudian di *vorteks* hingga homogen dan didiamkan selama 3 jam dalam kondisi gelap. Setelah dilakukan *spiking*, didapatkan larutan hasil *spiking* dengan kandungan pestisida sipermetrin sebesar 100 ppm.

3.4.3. Fotodegradasi UV-B terhadap Sampel Ekstrak Teh (*Camellia sinensis*)

Tahapan fotodegradasi UV-B terhadap sampel ekstrak teh diadopsi dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya merujuk pada penelitian (Zheng dkk., 2023) dengan beberapa modifikasi menyesuaikan tujuan analisis yang dilakukan. Fotodegradasi menggunakan radiasi UV-B dilakukan dengan variasi waktu penyinaran selama 0; 15; 30; dan 45 menit. Tujuannya untuk mengetahui waktu radiasi paling optimal dan tingkat degradasi pestisida sipermetrin dalam sampel teh seiring dengan penambahan waktu penyinaran radiasi UV-B. Sampel dalam penelitian disiapkan dalam jumlah duplo untuk memaksimalkan hasil analisis.

3.4.4. Ekstraksi Cair-Cair dan *Clean-up* dengan QuEChERS

Metode yang paling efektif digunakan untuk ekstraksi pestisida dari matriks teh meliputi ekstraksi cair-cair (LLE) dengan menggunakan pelarut organik diikuti dengan *clean-up* menggunakan metode ekstraksi fasa padat terdispersi (d-SPE) untuk pembersihan ekstrak (Reddy & Reddy, 2017). Ekstraksi pestisida sipermetrin dalam seduhan teh hijau dan teh hitam dilakukan berdasarkan metode yang diadopsi dari penelitian Pitoi dkk., (2020) dengan memodifikasi perbandingan pelarut. Dalam ekstraksi cair-cair dilakukan optimasi didasarkan pada penelitian Pitoi dkk., (2020) menggunakan tiga jenis pelarut organik meliputi asetonitril (ACN), etil asetat, dan heksana. Tahapan ekstraksi dilakukan dengan diambil larutan hasil *spiking* sebanyak 3 mL dalam dan ditambahkan pelarut ekstraksi (v/v, 1:1) dan divorteks agar pelarut terdistribusi. Tujuan ekstraksi dengan pelarut ialah untuk mengekstraksi pestisida dari matriks sehingga didapatkan ekstrak yang hanya mengandung pestisida sipermetrin.

Campuran dari larutan hasil *spiking* dengan pelarut idealnya akan membentuk larutan yang terbagi menjadi dua fasa yaitu fasa organik dan fasa air sehingga dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 8 menit untuk memastikan terpisahnya antara kedua fasa tersebut. Hasilnya, supernatan pada bagian fasa organik yang kemungkinan mengandung pestisida sipermetrin dipipet dan dimasukkan tabung reaksi sedangkan fasa bawah yaitu fasa air ditambahkan kembali dengan 3 mL pelarut untuk dilakukan ekstraksi kedua. Tahapan yang sama dilakukan kembali seperti sebelumnya sehingga diambil supernatan pada bagian fasa organik yang mengandung pestisida sipermetrin dan digabungkan ke dalam tabung reaksi hasil ekstraksi pertama. Larutan hasil ekstraksi tersebut diuapkan hingga mencapai volume yang sama saat ekstraksi pertama dengan pemanasan menggunakan penangas air dengan suhu dijaga berada dibawah titik didih pestisida sipermetrin. Hasil proses ekstraksi dengan pelarut terbaiklah yang akan dipindahkan kedalam tabung falcon 15 mL untuk selanjutnya digunakan

pada tahapan optimasi dengan atau tanpa penggunaan QuEChERS, yang digunakan untuk tujuan pembersihan ekstrak menggunakan metode d-SPE dengan sorben tertentu.

Pada metode pembersihan ekstrak atau *clean-up* dengan QuEChERS dilakukan dengan menambahkan 2 mL ekstrak hasil ekstraksi kedalam 0,3550 g QuEChERS yang mengandung 900 mg MgSO₄, 15 mg GCB, dan 150 mg PSA. Kemudian dilakukan vortex untuk memaksimalkan proses *clean-up* dilanjut sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 8 menit sehingga dapat terpisah menjadi bagian residu dan supernatan yang hanya mengandung pestisida sipermetrin dalam pelarut organik. QuEChERS dalam residu diharapkan mampu menyerap kandungan lain seperti pigmen, kafein dan zat lain yang masih terdapat dalam ekstrak yang dapat menyebabkan efek degeneratif pada puncak kromatografi, bentuk, retensi analit, pergeseran waktu, maupun hilangnya sensitivitas pada saat analisis dengan instrumen (Yin dkk., 2014). Hasil ekstrak dipipet sebanyak 1 mL kedalam vial 2 mL untuk disimpan dalam lemari pendingin sebelum dianalisis kadar pestisida sipermetrin menggunakan GC-FID.

3.4.5. Analisis Pestisida Sipermetrin pada Ekstrak Teh menggunakan GC-FID

Optimasi terhadap kondisi GC perlu dilakukan untuk mendeteksi metode atau kondisi yang sesuai untuk analisis standar sipermetrin sebelum dilakukan analisis deret standar untuk pembuatan kurva standar dan analisis hasil fotodegradasi dengan radiasi UV-B. Metode GC-FID yang digunakan didasarkan pada penelitian Vani dkk., (2012) dengan beberapa modifikasi menyesuaikan tujuan analisis. Sampel dianalisis dengan GC Shimadzu 2010 dengan detektor FID dan dilengkapi dengan *automatic sample injector* Shimadzu seri AOC-20i. Parameter instrumen GC-FID dalam penelitian ini secara lengkap ditunjukkan dalam tabel berikut:

Tabel 3.1. Kondisi GC-FID

GC	Shimadzu 2010
Column	DB-5 (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm) Programmed temp: 170 °C; hold 0 min 310 °C; rate 11 °C/min; hold 1 min Total program time: 13.73 min
Injection mode	Split 1:5 Injection temp: 280 °C
Gas	Carrier gas: N ₂ : 1.5 mL/min Makeup gas: N ₂ : 30 mL/min H ₂ : 40 mL/min O ₂ : 400 mL/min
Detector FID	Detector temp: 310 °C

Analisis kuantitatif pestisida sipermetrin hasil analisis GC-FID dilakukan melalui perangkat lunak *GC-Solution* yang berperan sebagai pengatur pengoperasian alat termasuk analisis hasil pengukuran. Dalam tahap ini, komponen dalam matriks teh termasuk pestisida sipermetrin yang telah terpisahkan akan meninggalkan kolom sesuai dengan waktu retensinya dan akan dideteksi jenis maupun jumlah tiap komponen oleh detektor FID yang dibakar dengan H₂ dan O₂ sehingga terjadi dekomposisi senyawa menghasilkan ion-ion yang terdeteksi oleh elektroda dalam detektor dimana jumlahnya sebanding dengan jumlah atom karbon yang terbakar dan akan direkam oleh rekorder menghasilkan kromatogram yang didalamnya terdapat waktu retensi dan luas area dari setiap komponen sehingga dapat dianalisis kadar dari pestisida sipermetrin dalam sampel.

3.4.6. Validasi Metode

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode dengan mengadopsi metode dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, setelah melakukan analisis menggunakan instrumen tertentu dalam hal ini GC-FID maka diperlukan suatu metode validasi untuk menunjukkan bahwa prosedur yang dilakukan sesuai dengan tujuan yang dimaksud dan memenuhi spesifikasi serta atribut kualitas yang telah ditentukan. Metode validasi meliputi uji linearitas, batas kuantifikasi, batas deteksi, akurasi, dan presisi (Yüksel & Şen, 2018).

Analisis konsentrasi pestisida sipermetrin dilakukan dengan membandingkan waktu retensi yang muncul dengan waktu retensi standar yang telah diketahui sebelumnya. Berdasarkan waktu retensi tersebut, dilakukan analisis dengan melakukan plot kurva kalibrasi dari luas area puncak terhadap lima konsentrasi deret standar pestisida sipermetrin diantaranya 0; 30; 60; 90; dan 120 ppm. Kurva kalibrasi tersebut menunjukkan linearitas dari hasil pengujian dengan konsentrasi analit dalam sampel.

Berdasarkan kurva kalibrasi dihasilkan persamaan regresi $y = ax + b$ dengan koefisien determinasi (R^2). Persamaan linear digunakan untuk penentuan kadar sipermetrin dalam sampel teh hijau maupun teh hitam dan R^2 digunakan untuk mengetahui linieritas pengukuran sampel dengan nilai koefisien korelasi yang baik ialah mendekati 1 atau $R^2 > 0,997$ (Handayani dkk., 2018a). Kurva standar juga dapat digunakan dalam untuk menghitung dan menentukan nilai LOD dan LOQ dari senyawa pestisida sipermetrin. Berdasarkan hasil analisis juga dapat ditentukan akurasi dan presisi metode GC-FID yang digunakan dengan analisis menggunakan sampel tanpa perlakuan iradiasi UV-B atau UV-B 0 menit, dengan hasil yang diperoleh berupa

persen perolehan kembali (*%recovery*) untuk akurasi dan standar deviasi relatif (*%RSD*) atau koefisien varians (*%CV*) untuk presisi.

Berdasarkan hasil analisis juga dapat diketahui tingkat degradasi atau penurunan konsentrasi senyawa pestisida dalam sampel yang dilakukan *treatment* dengan variasi waktu radiasi UV-B selama 0; 15; 30; dan 45 menit. Rumus *%degradasi* senyawa pestisida sipermetrin ditunjukkan pada persamaan berikut yang didasarkan pada penelitian (Widihati dkk., 2011).

$$\%degradasi = \frac{\text{Sampel TR} - \text{Sampel R}}{\text{Sampel TR}} \times 100\%$$

Keterangan:

Sampel TR = sampel tanpa radiasi

Sampel R = sampel hasil radiasi

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, dapat dianalisis besarnya penurunan konsentrasi atau tingkat degradasi pestisida sipermetrin pada setiap sampel baik seduhan teh hijau maupun teh hitam dengan berbagai perlakuan variasi waktu radiasi UV-B.