

SURAT TUGAS


Nomor : 00388/B.7.9/ST.FTP/02/2021

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang dengan ini memberikan tugas kepada:


- Nama : Inneke Hantoro, STP, M.Sc. (Ketua)
Prof. Dr. Ir. Budi Widianarko, MSc. (Anggota)
Dr. Ir. Christiana Retnaningsih, MP. (Anggota)
- Status : Dosen Fakultas Teknologi Pertanian
Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.
- Tugas : Sebagai Penulis Buku "**Protokol HW1-TP Unika Metode Deteksi dan Identifikasi Mikroplastik dengan ATR- FTIR Mikroskopi pada Sampel Hasil Laut**"
- Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Soegijapranata,
Semarang.
- Lain-lain : Harap melaksanakan tugas dengan sebaik-baiknya dan penuh tanggung jawab, serta memberikan laporan setelah selesai melaksanakan tugas.

Semarang, 08 Februari 2021

Dekan,


Dr. R. Probo Y. Nugrahedhi, M. Sc.

NPP : 0581 2001 244



PROTOKOL HW 1-TP UNIKA METODE DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MIKROPLASTIK DENGAN ATR-FTIR MIKROSKOPI PADA SAMPEL HASIL LAUT

Salah satu ranah penelitian mikroplastik yang tengah berkembang pesat adalah kajian keamanan pangan. Dalam kajian keamanan pangan mikroplastik, metode ekstraksi dan isolasi partikel mikroplastik menempati posisi yang krusial. Partikel mikroplastik yang menempel atau bahkan berada dalam bahan pangan yang notabene adalah jaringan hewan atau tumbuhan tentu saja memerlukan perlakuan khusus.

Buku kecil ini memuat secara lengkap namun lugas sebuah protokol tentang deteksi dan identifikasi mikroplastik menggunakan piranti ATR-FTIR mikroskopi pada sampel hasil laut. Semoga protokol ini bermanfaat bagi sejawat peneliti, dosen dan mahasiswa yang berminat pada mikroplastik sebagai kontaminan baru yang belakangan ini banyak mendapatkan perhatian baik oleh kalangan ilmiah, dunia industri, pembela lingkungan maupun pengambil kebijakan.

ISBN 978-623-7637-80-0



PROTOKOL HW 1-TP UNIKA: METODE DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MIKROPLASTIK
DENGAN ATR-FTIR MIKROSKOPI PADA SAMPEL HASIL LAUT



PROTOKOL HW 1-TP UNIKA METODE DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MIKROPLASTIK DENGAN ATR-FTIR MIKROSKOPI PADA SAMPEL HASIL LAUT

**Inneke Hantoro, STP, MSc.
Prof. Dr. Budi Widianarko
Dr. Christiana Retnaningsih**

**PROTOKOL HW1-TP UNIKA
“METODE DETEKSI DAN
IDENTIFIKASI MIKROPLASTIK
DENGAN ATR-FTIR MIKROSKOPI
PADA SAMPEL HASIL LAUT”**

**Tim Penyusun:
Inneke Hantoro, STP, MSc.
Prof. Dr. Budi Widianarko
Dr. Christiana Retnaningsih**

**Penerbit Wahana Resolusi
2020**

Undang-Undang Republik Indonesia No. 19 Tahun 2002 tentang Hak Cipta

Sanksi Pelanggaran Hak Cipta

Lingkup Hak Cipta

Pasal 2

1. Hak Cipta merupakan hak eksklusif bagi pencipta dan pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan menurut peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Ketentuan Pidana

Pasal 72

1. Barang siapa dengan sengaja atau tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (1) dan (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp. 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 5.000.000.000,00, (lima milyar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau Hak terkait sebagaimana dimaksud dalam ayat (1) dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

**PROTOKOL HW1-TP UNIKA
METODE DETEKSI DAN
IDENTIFIKASI MIKROPLASTIK
DENGAN ATR-FTIR MIKROSKOPI
PADA SAMPEL HASIL LAUT**

**Tim Penyusun:
Inneke Hantoro, STP, MSc.
Prof. Dr. Budi Widianarko
Dr. Christiana Retnaningsih**

PROTOKOL HW1-TP UNIKA “METODE DETEKSI DAN IDENTIFIKASI MIKROPLASTIK DENGAN ATR- FTIR MIKROSKOPI PADA SAMPEL HASIL LAUT

Penyusun : Inneke Hantoro, STP, MSc.
Prof. Dr. Budi Widianarko
Dr. Christiana Retnaningsih
Editor : Budi Widianarko
Penata Letak : Tim Penerbit
Desain Sampul : Tim Penerbit

Diterbitkan oleh:

Penerbit Wahana Resolusi

Jl Golo, Umbulharjo, Yogyakarta 55161

www.penerbitwr.com

Hantoro, Inneke, et.al.. *Protokol HW1-TP UNIKA “Metode Deteksi dan Identifikasi Mikroplastik dengan ATR-FTIR Mikroskopi pada Sampel Hasil Laut*. Yogyakarta: Wahana Resolusi, 2020.
x+44 hlm, 14,8 x 21 cm

ISBN 978-623-7639-80-0

Cetakan 1, Desember 2020

Perpustakaan Nasional:
Katalog dalam Terbitan
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
All Right Reserved

KATA PENGANTAR

Dalam lima tahun terakhir ini terjadi perkembangan yang sangat cepat dalam teknik analisis mikroplastik sebagai suatu kontaminan baru. Berbagai laboratorium di segenap penjuru dunia “berlomba” menemukan metode analisis yang paling praktis, efektif namun tidak meninggalkan aspek akurasi hasil.

Berhadapan dengan suatu jenis kontaminan baru, seperti mikroplastik, para pihak yang bekerja dalam ranah analisis kimia ternyata cukup sigap dalam memberikan tanggapan. Salah satunya adalah dengan merekomendasikan penggunaan teknik Fourier-Transform Infra Red Spectroscopy (FTIR) untuk mengidentifikasi “species” kimia (polimer) mikroplastik. Teknik FTIR sangat menarik untuk digunakan karena kepraktisan dan kecepatan deteksinya.

Sayangnya kepraktisan dan kecepatan deteksi dan identifikasi mikroplastik menggunakan FTIR mengandaikan suatu persyaratan bahwa partikel mikroplastik telah terisolasi secara utuh dalam sediaan yang akan diukur. Dengan demikian diperlukan teknik ekstraksi dan isolasi partikel mikroplastik yang efektif dan dapat diandalkan (*reliable*) sehingga hasil pembacaan FTIR yang diperoleh nantinya akan sah (*valid*).

Salah satu ranah penelitian mikroplastik yang tengah berkembang pesat adalah kajian keamanan pangan. Dalam

kajian keamanan pangan mikroplastik, metode ekstraksi dan isolasi partikel mikroplastik menempati posisi yang krusial. Partikel mikroplastik yang menempel atau bahkan berada dalam bahan pangan yang notabene adalah jaringan hewan atau tumbuhan tentu saja memerlukan perlakuan khusus. Untuk itu diperlukan sebuah protokol untuk melaksanakan deteksi dan identifikasi partikel mikroplastik yang handal dan teruji – mulai dari tahapan ekstraksi partikel dari bahan pangan hingga konfirmasi jenis polimernya.

Buku kecil ini memuat secara lengkap namun lugas sebuah protokol tentang deteksi dan identifikasi mikroplastik menggunakan piranti ATR-FTIR mikroskopi pada sampel hasil laut. Protokol yang diberi nama HW1-TP UNIKA ini merupakan salah satu luaran penting dari Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi yang didanai oleh Direktorat Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset dan Teknologi/Badan Riset dan Inovasi Nasional sesuai dengan Kontrak Penelitian Tahun Anggaran 2019-2020 No. 00537/H.2/LPPM/III/2020. Semoga protokol ini bermanfaat bagi sejawat peneliti, dosen dan mahasiswa yang berminat pada mikroplastik sebagai kontaminan baru yang belakangan ini banyak mendapatkan perhatian baik oleh kalangan ilmiah, dunia industri, pembela lingkungan maupun pengambil kebijakan.

Semarang, 10 Desember 2020

Inneke Hantoro
Budi Widianarko
Christiana retnaningsih

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
1. PENGANTAR	1
2. MATERI	1
2.1. Bahan Kimia	1
2.2. Bahan penunjang	1
2.3. Alat	2
3. METODE	2
3.1. Preparasi Sampel	2
3.2. Preparasi larutan	5
3.3. Penjaminan Mutu Analisis	7
3.4. Proses Digesti Sampel Hasil Laut	8
3.5. Deteksi dan Kuantifikasi Mikroplastik dengan Mikroskop	15
3.6. Identifikasi Partikel Menggunakan ATR-FTIR Imaging	20
REFERENSI	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Preparasi sampel hasil laut	2
Tabel 2. Rasio sampel dan pelarut, suhu, serta waktu inkubasi untuk proses digesti sampel hasil laut	9

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Proses diseksi organ pencernaan ikan bandeng	5
Gambar 2.	Garam NaCl (pro analysis) yang digunakan untuk pemisahan berdasarkan densitas	6
Gambar 3.	Pembuatan larutan NaCl jenuh (1,2 g/cm ³)	6
Gambar 4.	Proses penyaringan pelarut yang digunakan untuk analisis	7
Gambar 5.	Larutan 30% H ₂ O ₂ yang digunakan untuk digesti sampel	9
Gambar 6.	Penuangan 30% H ₂ O ₂ ke sampel yang dilakukan di lemari asam	10
Gambar 7.	Inkubasi sampel di oven yang bersuhu 65°C ...	11
Gambar 8.	Sampel paska digesti 24 jam di suhu 65°C	12
Gambar 9.	Proses penyaringan sampel paska digesti	12
Gambar 10.	Hasil penyaringan sampel setelah digesti	13
Gambar 11.	Penambahan larutan NaCl jenuh pada kertas saring yang berisi sampel	14
Gambar 12.	Penyaringan sampel hasil pemisahan berdasarkan densitas	14
Gambar 13.	Kertas saring yang berisi partikel yang diduga mikroplastik	15
Gambar 14.	Peletakan kertas saring bersih di samping mikroskop selama pengamatan berlangsung sebagai kontrol kontaminasi dari udara dan lingkungan sekitar	16
Gambar 15.	Pengamatan blanko di bawah mikroskop	16
Gambar 16.	Pengamatan sampel di bawah mikroskop	17
Gambar 17.	Contoh citra visual partikel yang diduga mikroplastik	18
Gambar 18.	Berbagai bentuk mikroplastik, yaitu: (1) pellet, (2) fragment, (3) fiber, (4) film, (5) tali dan filamen, dan (7) spons/busa	19
Gambar 19.	Mikroplastik berbentuk sphere/ microbead	20

Gambar 20. FTIR-Imaging (IRTracer-100 dan AIM-9000) di Laboratorium FTP Unika Soegijapranata	21
Gambar 21. Pemasangan ATR Pressure Sensor pada AIM-9000	22
Gambar 22. Perlengkapan untuk menangani nitrogen cair dengan aman	23
Gambar 23. Pengisian nitrogen cair ke AIM-9000	24
Gambar 24. Semua instrumen dan komputer dalam kondisi menyala (tanda panah menunjukkan indikator lampu pada IRTracer-100 dan AIM-9000)	25
Gambar 25. Membuka program AIM Solution	26
Gambar 26. Proses inisiasi instrumen FTIR	26
Gambar 27. Proses monitoring instrumen FTIR	27
Gambar 28. Monitoring energi instrumen	28
Gambar 29. Pemasangan ATR Objective pada AIM-9000	29
Gambar 30. Pengaturan peletakan sampel pada mikroskop AIM-9000	30
Gambar 31. Pengaturan camera untuk observasi visual sampel	31
Gambar 32. Perubahan pengaturan dari wide-field camera ke resolusi yang lebih fokus dan pencarian fokus gambar sampel	32
Gambar 33. Pengambilan gambar titik pada sampel yang akan diidentifikasi	33
Gambar 34. Pengaturan penyimpanan data pengukuran ...	34
Gambar 35. Notifikasi untuk mengganti posisi ATR Objective sebelum melakukan pengukuran	35
Gambar 36. Pemindahan posisi ATR Objective ke mode pengukuran	36
Gambar 37. Instruksi untuk menekan sampel dengan prisma Ge ATR	37
Gambar 38. Pencocokan spektra sampel dengan database yang ada di library program	38
Gambar 39. Hasil pembacaan FTIR	39
Gambar 40. Spektra polimer EEA yang teridentifikasi dari sampel kerang	40

1. PENGANTAR

Protokol ini mendeskripsikan deteksi dan identifikasi mikroplastik pada beberapa sampel hasil laut, yang meliputi kerang darah (*Anadara granosa*), ikan bandeng (*Chanos chanos*), dan udang putih (*Litopenaeus vannamei*). Metode deteksi meliputi dua tahapan, yaitu digesti dan pengamatan visual mikroplastik di bawah mikroskop. Metode digesti mikroplastik diadopsi dari Li et al. (2015) dan Waite et al. (2018) yang menggunakan 30% H₂O₂ sebagai pelarut. Protokol ini merupakan hasil optimasi dari kedua metode tersebut.

2. MATERI

2.1. Bahan kimia

- 30% H₂O₂
- NaCl (densitas 1,2 g/cm³)
- Aquabidest
- Etanol 70%

2.2. Bahan penunjang

- Whatman 540 (pore size 8 µm)
- Aluminium foil
- Sarung tangan nitril

2.3. Alat




- erlenmeyer 100 atau 200 ml
- gelas piala
- petridish
- pipet
- gelas arloji
- pompa vakum
- oven
- Mikroskop Olympus BX-41
- FTIR Imaging (IR Tracer 100 dan AIM 9000) dari Shimadzu dengan fitur ATR

3. METODE

3.1. Preparasi Sampel

1. Sampel *seafood* yang akan dianalisis diukur dan ditimbang dulu beratnya dengan ketentuan sbb:

Tabel 1. Preparasi sampel hasil laut

Jenis hasil laut	Bagian yang diukur	Bagian yang ditimbang
Ikan bandeng 	▪ Panjang ikan 	▪ Berat ikan segar  ▪ Berat ikan setelah di- <i>thawing</i> (apabila sampel

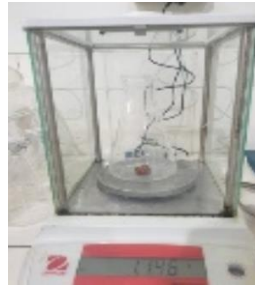
sebelumnya disimpan di freezer)

- Berat bagian pencernaan ikan



Jenis hasil laut	Bagian yang diukur	Bagian yang ditimbang
<p data-bbox="239 659 325 687">Udang</p> 	<ul data-bbox="412 659 617 722" style="list-style-type: none">▪ Panjang tubuh udang 	<ul data-bbox="711 659 983 1070" style="list-style-type: none">▪ Berat udang segar  <ul data-bbox="711 882 983 1070" style="list-style-type: none">▪ Berat udang setelah dilakukan <i>thawing</i> (apabila sampel sebelumnya disimpan di freezer)
<p data-bbox="191 1110 374 1139">Kerang darah</p> 	<ul data-bbox="412 1110 583 1209" style="list-style-type: none">▪ Diameter cangkang kerang 	<ul data-bbox="711 1110 967 1209" style="list-style-type: none">▪ Berat kerang utuh (dengan cangkang) 

-
- Berat kerang utuh setelah dilakukan *thawing* (apabila sampel sebelumnya disimpan di *freezer*)
 - Berat jaringan edibel



2. Diseksi dilakukan apabila perlu, misal untuk jaringan pencernaan ikan. Proses diseksi harus dilakukan di ruang asam yang sudah dibersihkan dengan etanol 70% dan tidak disarankan menggunakan peralatan yang mengandung plastik.

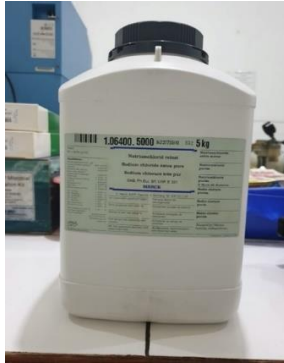


Gambar 1. Proses diseksi organ pencernaan ikan bandeng

3. Apabila sampel hasil laut tidak langsung dianalisis, maka sampel disimpan di *freezer* bersuhu -20°C .

3.2. Preparasi larutan

1. Untuk membuat larutan NaCl dengan densitas $1,2 \text{ g/cm}^3$ dibutuhkan 337 g NaCl dan dilarutkan dengan 1 L aquabidest pada labu takar 1 L.



Gambar 2. Garam NaCl (*pro analysis*) yang digunakan untuk pemisahan berdasarkan densitas

2. Larutan garam tersebut diaduk dengan pengaduk magnetik (*magnetic stirrer*), sampai semua bubuk NaCl terlarut ke dalam air, tidak ada lagi partikel yang tersuspensi.



Gambar 3. Pembuatan larutan NaCl jenuh ($1,2 \text{ g/cm}^3$)

3. Larutan yang sudah homogen disaring dengan kertas saring Whatman 540 menggunakan filtrasi vakum.



Gambar 4. Proses penyaringan pelarut yang digunakan untuk analisis

4. Larutan NaCl siap digunakan.
5. Larutan NaCl diusahakan selalu baru ketika akan digunakan untuk analisis.

3.3. Penjaminan Mutu Analisis

1. Sebelum melakukan analisis, perlengkapan dasar seperti jas lab katun, sarung tangan nitril dan masker harus dikenakan. Setelah mengenakan sarung tangan nitril, tangan perlu disemprot dulu dengan etanol 70%.
2. Area kerja, disarankan di lemari asam, harus dibersihkan dulu dengan etanol 70%.

3. Semua peralatan gelas, dicuci bersih, dibilas dengan aquabidest, disemprot dengan etanol 70%, dan dikeringkan dalam oven sebelum digunakan. Sedapat mungkin tidak menggunakan peralatan yang terbuat dari plastik.
4. Semua alat gelas ditutup dengan aluminium foil kapan pun dan dimana pun memungkinkan. Sampel segera ditutup oleh aluminium foil jika tidak digunakan. Hal ini ditujukan untuk mencegah kontaminasi mikroplastik dari udara dan lingkungan sekitar.
5. Semua larutan yang digunakan harus disaring terlebih dahulu dengan kertas saring Whatman 540.
6. Untuk memastikan tidak ada kontaminasi dari larutan yang dipakai atau dari lingkungan sekitar, setiap melakukan analisis harus disertai dengan blanko (tanpa sampel) minimal dua ulangan.

3.4. Proses Digesti Sampel Hasil Laut

1. Sampel yang sudah diukur dan ditimbang beratnya dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan larutan 30% H_2O_2 . Penambahan 30% H_2O_2 dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari pembentukan busa. Jumlah larutan hidrogen peroksida

yang ditambahkan tergantung dari jenis sampel hasil laut, yang disarankan di Tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Rasio sampel dan pelarut, suhu, serta waktu inkubasi untuk proses digesti sampel hasil laut

Jenis Hasil Laut	Rasio sampel : 30% H ₂ O ₂ (w/v)	Suhu inkubasi (°C)	Lama inkubasi (jam)
Ikan bandeng	1 : 10	65	24
Udang	1 : 20	65	48
Kerang darah	1 : 20	65	24



Gambar 5. Larutan 30% H₂O₂ yang digunakan untuk digesti sampel



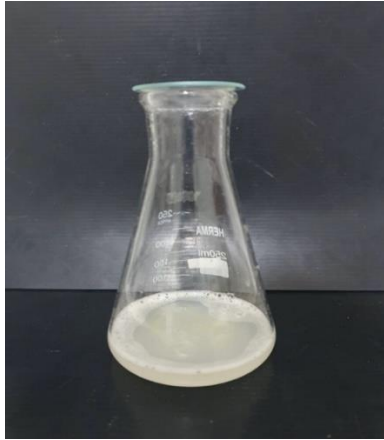
Gambar 6. Penuangan 30% H₂O₂ ke sampel yang dilakukan di lemari asam

2. Selanjutnya sampel disimpan dalam oven pada suhu 65°C dengan durasi waktu seperti yang disampaikan di Tabel 2. Selama reaksi dalam oven, setiap erlenmeyer yang berisi sampel ditutup dengan gelas arloji (atau menggunakan erlenmeyer yang bertutup) untuk menghindari pelepasan gas dan untuk mencegah kontaminasi udara.



Gambar 7. Inkubasi sampel di oven yang bersuhu 65°C

3. Setelah waktu digesti tercapai, sampel dikeluarkan dari oven didinginkan pada suhu ruang dan proses digesti dilanjutkan selama 24-48 jam berikutnya di suhu ruang (lemari asam). Lama waktu perpanjangan digesti di suhu ruang tergantung dari masih ada tidaknya sampel yang belum didigesti secara sempurna. Saat disimpan di suhu ruang dipastikan mulut erlenmeyer dalam kondisi tertutup untuk mencegah kontaminasi.



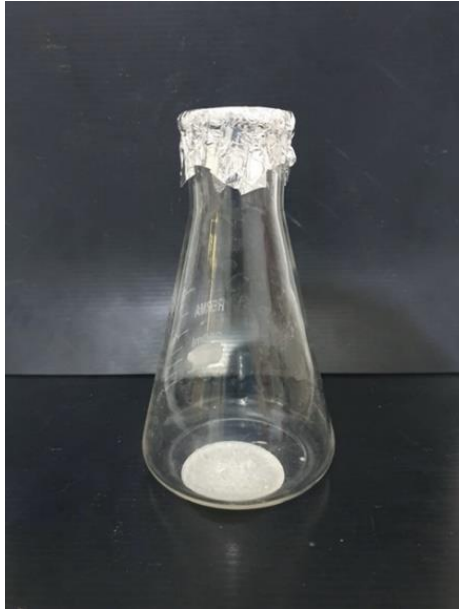
Gambar 8. Sampel paska digesti 24 jam di suhu 65°C

4. Sampel disaring melalui kertas saring Whatman 540 dengan menggunakan pompa vakum, erlenmeyer dan sisi gelas penampung pada perangkat filtrasi vakum dibilas dengan aquabidest untuk memastikan tidak ada partikel yang tertinggal.



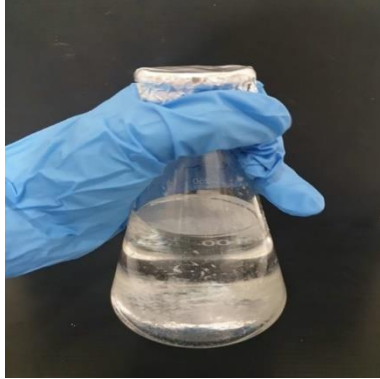
Gambar 9. Proses penyaringan sampel paska digesti

5. Kertas saring ditempatkan dalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan dengan 250 ml larutan garam jenuh ($1,2 \text{ g} / \text{cm}^3 \text{ NaCl} - 337 \text{ g}$) ditambahkan dengan 1 L aquabidest).



Gambar 10. Hasil penyaringan sampel setelah digesti

6. Sampel diaduk secara manual (dengan menggoyang erlenmeyer perlahan) selama 2 menit dan diikuti dengan waktu pengendapan selama 24 jam pada suhu ruang.



Gambar 11. Penambahan larutan NaCl jenuh pada kertas saring yang berisi sampel

7. Setelah 24 jam, larutan dipindahkan dengan hati-hati disaring melalui kertas saring Whatman 540, erlenmeyer dan sisi gelas penampung pada perangkat filtrasi vakum dibilas dengan aquabidest untuk memastikan tidak ada partikel yang tertinggal.



Gambar 12. Penyaringan sampel hasil pemisahan berdasarkan densitas

8. Kertas saring yang berisi partikel mikroplastik hasil penyaringan disimpan dalam Petri dish bersih dan selanjutnya diamati di bawah mikroskop.



Gambar 13. Kertas saring yang berisi partikel yang diduga mikroplastik

3.5. Deteksi dan Kuantifikasi Mikroplastik dengan Mikroskop

1. Sebelum pengamatan dimulai, disiapkan sebuah Petri dish yang berisikan kertas saring Whatman 540 yang masih bersih (perlu dicek di bawah mikroskop dulu). Petri dish diletakkan di samping mikroskop, dengan fungsi sebagai kontrol untuk memastikan ada tidaknya kontaminasi dari udara di lingkungan sekitar selama pengamatan berlangsung.



Gambar 14. Peletakan kertas saring bersih di samping mikroskop selama pengamatan berlangsung sebagai kontrol kontaminasi dari udara dan lingkungan sekitar

2. Kertas saring yang berisikan partikel mikroplastik diletakkan di bawah mikroskop untuk diamati. Disarankan untuk melakukan pengamatan pada blanko terlebih dahulu.



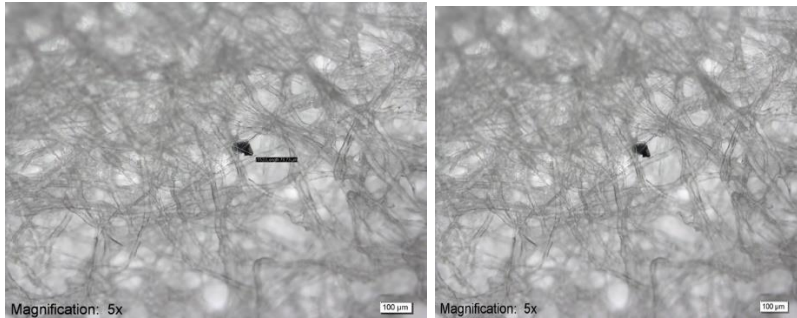
Gambar 15. Pengamatan blanko di bawah mikroskop

3. Pengamatan disarankan dari bagian kiri atas menuju kanan atas, dan secara bertahap pengamatan diarahkan pada kertas saring bagian tengah dan bawah dengan arah pengamatan yang sama, yaitu dari kiri ke kanan. Perlu dipastikan bahwa semua area kertas saring teramati sehingga tidak ada partikel yang terlewat.



Gambar 16. Pengamatan sampel di bawah mikroskop

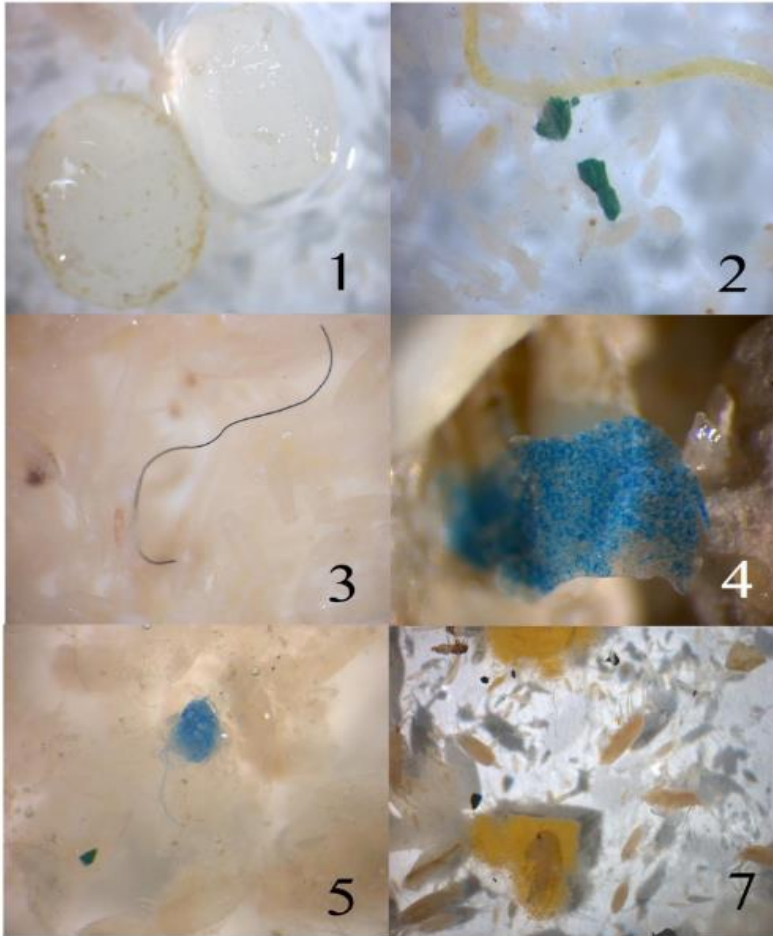
4. Perbesaran lensa objektif dan okuler (magnifikasi) harus dicatat.
5. Setiap partikel yang diamati diambil gambarnya dan difoto dengan menampilkan skala gambar dan disimpan dengan nama tersendiri.



Gambar 17. Contoh citra visual partikel yang diduga mikroplastik

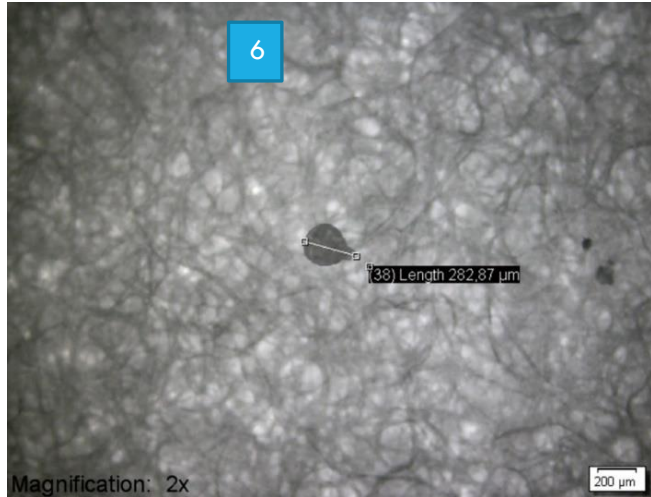
6. Setiap partikel yang ditemukan dicek apakah dapat diduga mikroplastik atau bukan dengan mencocokkan partikel yang didapat pada blanko.
7. Penggolongan bentuk sampel dilakukan berdasarkan dari standar yang ada, yaitu mengacu pada Gago *et al.* (2018).

Ada 7 kriteria yang bisa digunakan, yaitu: (1) *pellet*, (2) *fragment*, (3) *fiber*, (4) *film*, (5) tali dan filamen, (6) *sphere/microbead* dan (7) *spons/busa*.



Sumber Gago *et al.* (2018)

Gambar 18. Berbagai bentuk mikroplastik, yaitu: (1) *pellet*, (2) *fragment*, (3) *fiber*, (4) *film*, (5) tali dan filamen, dan (7) spons/busa



Sumber: penelitian PTUPT Widianarko et al. (2019)

Gambar 19. Mikroplastik berbentuk *sphere*/ *microbead*

8. Setiap partikel yang diduga mikroplastik diukur panjang (sisi terpanjang) dan ukuran yang lain bila diperlukan (luas area, keliling, dsb) menggunakan program yang tersedia di program mikroskop atau menggunakan *software* Image J.

3.6. Identifikasi Partikel Menggunakan ATR-FTIR Imaging

1. Identifikasi partikel yang diduga sebagai mikroplastik dilakukan dengan menggunakan alat FTIR (IRTracer-100) yang digabungkan dengan *Microscope* AIM-9000, keduanya dari Shimadzu. Pengukuran spektra dilakukan

dengan metode *Attenuated Total Reflection (ATR)* yang menggunakan prisma Germanium (Ge).



Gambar 20. FTIR-Imaging (IRTracer-100 dan AIM-9000) di Laboratorium FTP Unika Soegijapranata

2. Sebelum melakukan identifikasi, dipastikan area kerja dalam kondisi bersih dan meja kerja untuk meletakkan sampel dibersihkan menggunakan etanol 70%.
3. Karena identifikasi menggunakan fitur ATR, sebelum dimulai, ATR Pressure Sensor dipasang pada AIM-9000.



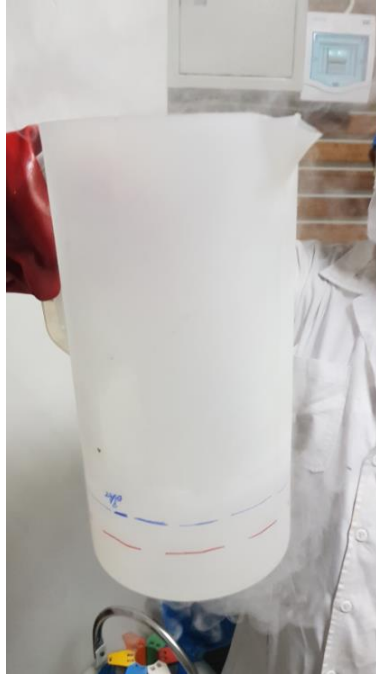
Gambar 21. Pemasangan ATR Pressure Sensor pada AIM-9000

4. Nitrogen cair diisikan pada kontainer yang ada di bagian atas perangkat AIM-9000 sebelum semua perangkat dinyalakan dengan tujuan untuk mendinginkan detektor. Saat menuang nitrogen cair ke gelas ukur, dipastikan jas lab dan sarung tangan khusus telah dipakai dengan benar.



Gambar 22. Perlengkapan untuk menangani nitrogen cair dengan aman

5. Nitrogen cair dituangkan ke gelas ukur sampai tanda tera, yang menandakan jumlah tersebut sesuai dengan volume kontainer di AIM-9000 dan dapat digunakan untuk analisis hingga 8 jam. Nitrogen cair dituangkan sedikit demi sedikit hingga memenuhi leher kontainer. Selanjutnya setelah asap nitrogen cair berkurang, kontainer ditutup.



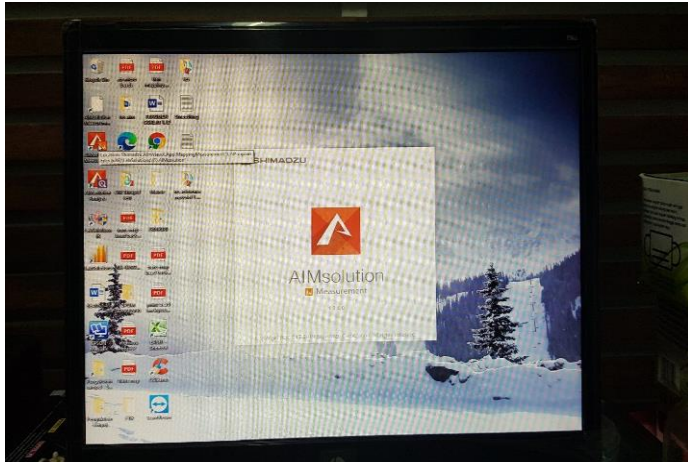
Gambar 23. Pengisian nitrogen cair ke AIM-9000

6. Power pada IRTracer-100 dan AIM-9000 dinyalakan (ditandai dengan lampu warna hijau pada IRTracer-100 dan biru pada AIM-9000).
7. Perangkat komputer untuk mengoperasikan instrumen juga dinyalakan.



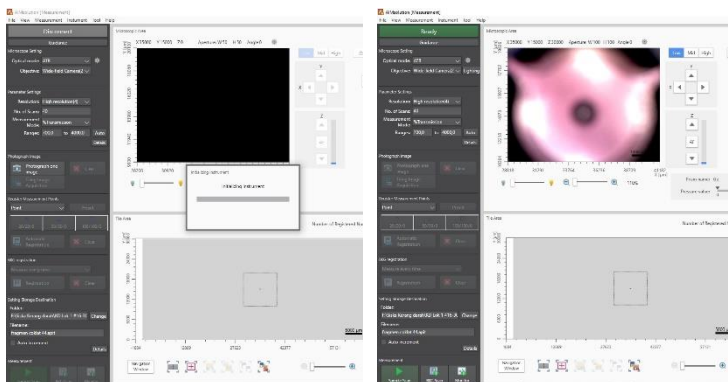
Gambar 24. Semua instrumen dan komputer dalam kondisi menyala (tanda panah menunjukkan indikator lampu pada IRTracer-100 dan AIM-9000)

8. Pilih program AIM Solution [Measurement] yang ada di komputer.



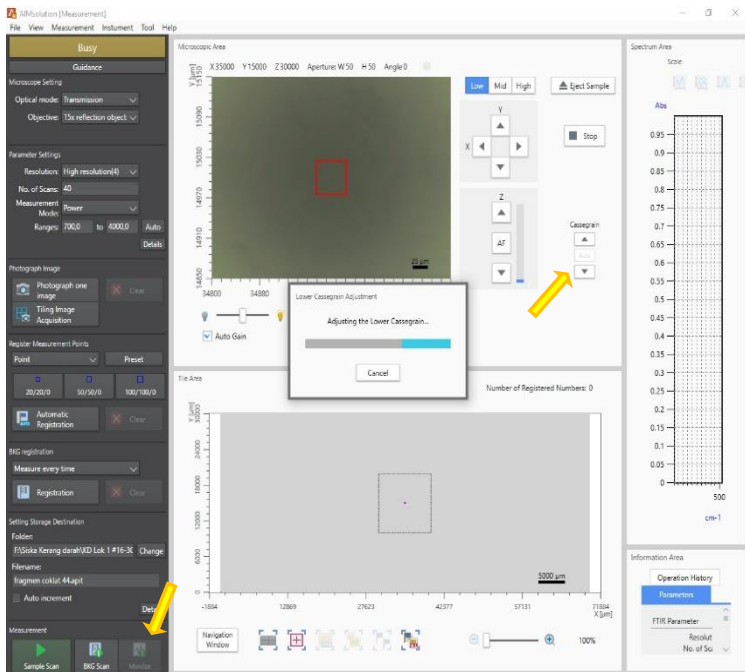
Gambar 25. Membuka program AIM Solution

9. Pada window program AIM Solution [Measurement] yang telah terbuka, klik fitur “Disconnect” di bagian kiri atas untuk melakukan inisialisasi instrumen terlebih dahulu. Proses inisiasi alat selesai ketika fitur “Disconnect” berubah menjadi “Ready” dan berwarna hijau.



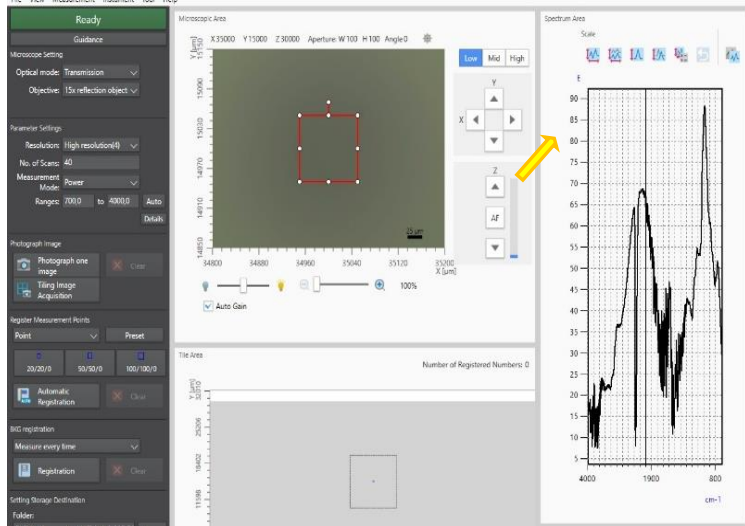
Gambar 26. Proses inisiasi instrumen FTIR

10. Sebelum melakukan proses pengukuran, supaya energi pada instrumen stabil dan memberikan performa yang baik, maka monitoring alat perlu dilakukan. Monitoring dilakukan dengan memilih pengaturan sbb: Optical Mode (Transmission), Objective (15x reflectio object), dan Measurement Mode (Power). Setelah itu klik “Auto” pada fitur “Cassegrain” untuk mengatur lensa bagian bawah, dan klik pilihan “Monitor” pada bagian kiri bawah dari window. Proses monitoring dilakukan selama kurang lebih 2 jam supaya kinerja alat stabil.



Gambar 27. Proses monitoring instrumen FTIR

11. Alat siap untuk digunakan bila energi (lihat bagian window sebelah kanan pada spectrum area) mencapai lebih dari 40 E pada puncak tertingginya. Setelah 2 jam, energi bisa mencapai 80-100 E.



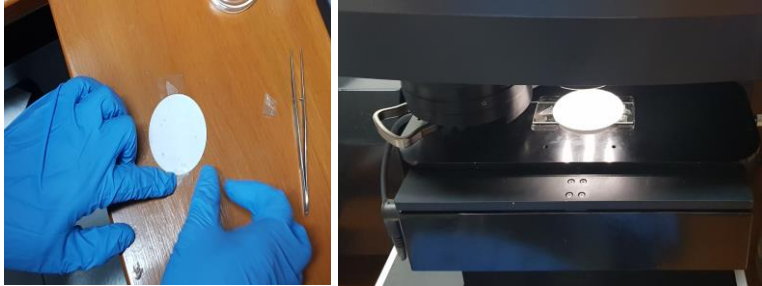
Gambar 28. Monitoring energi instrumen

12. Setelah energi stabil, prisma Ge ATR (ATR Objective) dipasang pada AIM-9000. Prisma dipasang pada mode visible observation (hingga hampir semua bagian ATR Objective masuk yang ditandai dengan bunyi klik 2 kali).



Gambar 29. Pemasangan ATR Objective pada AIM-9000

13. Selanjutnya sampel yang ada di atas kertas saring diletakkan di bagian tengah ATR Pressure Sensor. Oleh karena kertas saring harus stabil (tidak boleh bergerak) selama pengukuran, maka dilakukan modifikasi tempat peletakan sampel, yaitu menggunakan preparat kaca yang ukuran (panjang, lebar dan tebal) sesuai dengan ATR Pressure Sensor. Kertas saring yang berisi sampel dilekatkan menggunakan perekat yang nanti bisa dilepas lagi di sisi kanan dan kiri yang tidak bersentuhan dengan sampel.



Gambar 30. Pengaturan peletakan sampel pada mikroskop AIM-9000

14. Pengaturan setting dilakukan sebagai berikut:

Microscope setting

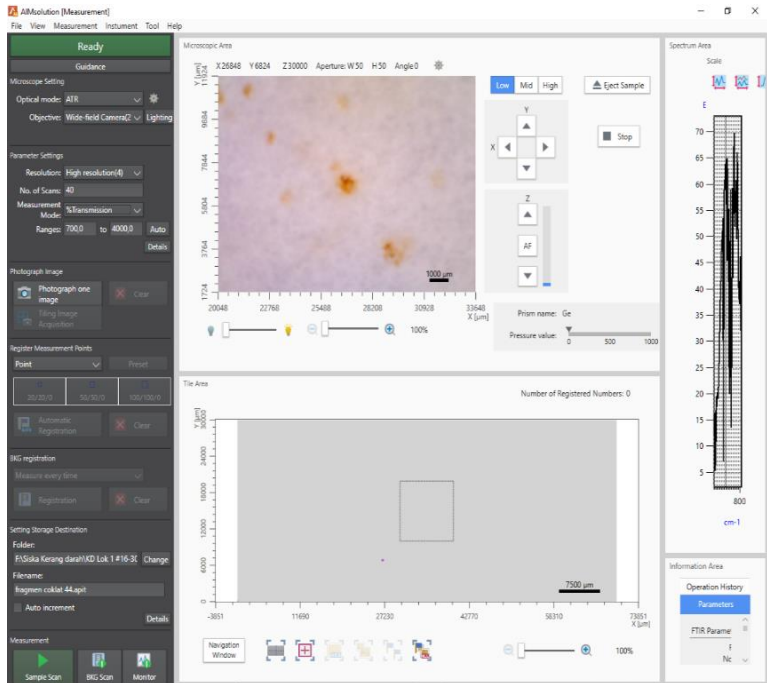
- Optical Mode: ATR
- Objectives: Wide-field Camera

Parameter setting

- Resolution: High
- No. of Scans: 40
- Measurement Mode: Reflectance
- Ranges: 700 – 4000

15. Setelah itu mikroskop diatur pada mode wide-field camera, maka pada layar akan tampak gambar sampel. Pengamatan dapat dimulai dari posisi kiri atas ke kanan atas dan selanjutnya menuju ke bagian bawah.

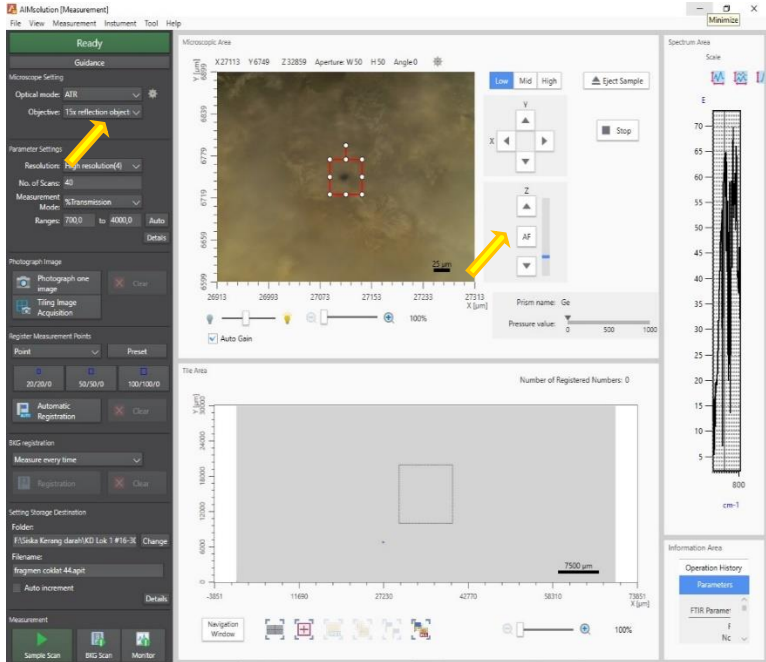
16. Klik salah satu objek yang tampak pada layar, maka secara otomatis objek tersebut akan berada di bagian tengah layar.



Gambar 31. Pengaturan camera untuk observasi visual sampel

17. Pindahkah Objectives Mode dari “wide-field camera” ke “15x resolutions”.

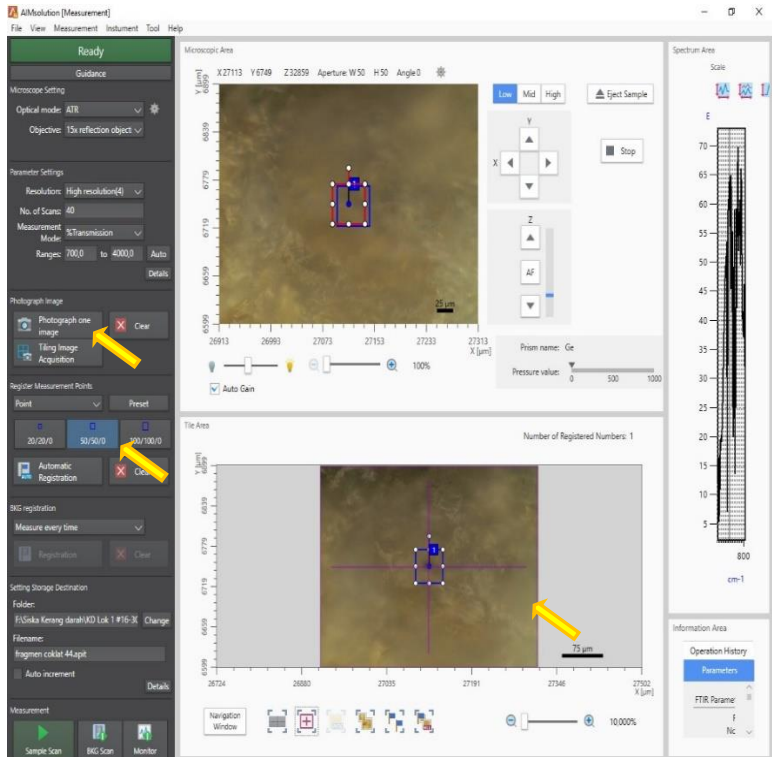
18. Selanjutnya dicari fokus gambar dari objek dengan menggeser fitur fokus (A-Z).



Gambar 32. Perubahan pengaturan dari wide-field camera ke resolusi yang lebih fokus dan pencarian fokus gambar sampel

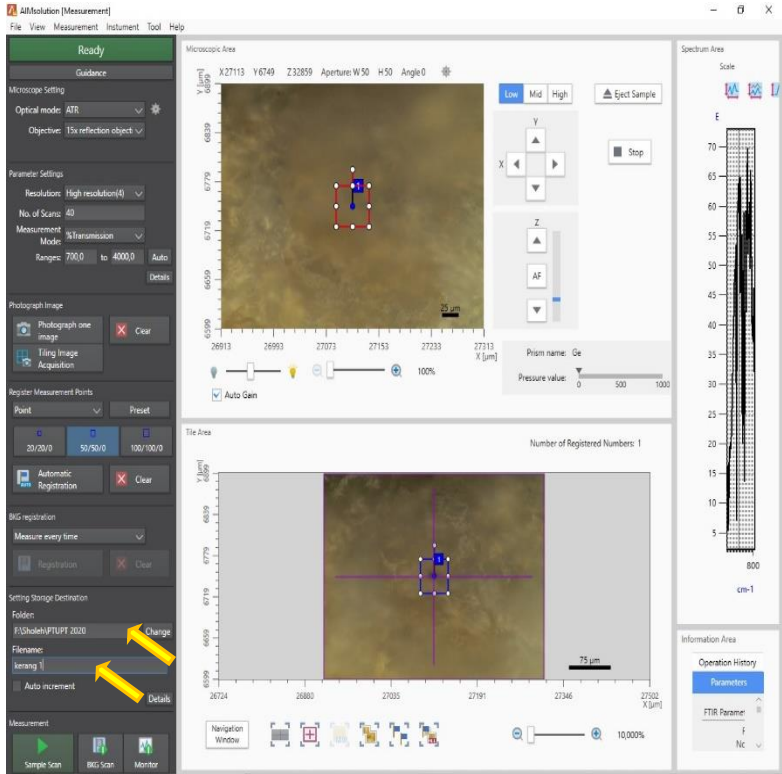
19. Bila fokus gambar sudah didapatkan, klik “Photograph one image” untuk mendapatkan gambar tetap dari objek yang sedang diamati.
20. Pada bagian “Register Measurement Point”, pilih fitur “Point” (artinya pengukuran dilakukan pada titik tertentu). Pilih aperture 20/20 atau 50/50 atau 100/100, yang disesuaikan dengan luas bidang objek yang diamati. Aperture 20/20 disarankan bila bidang objek sangat

kecil, sedangkan bila bidang objek cukup luas disarankan menggunakan aperture 50/50.



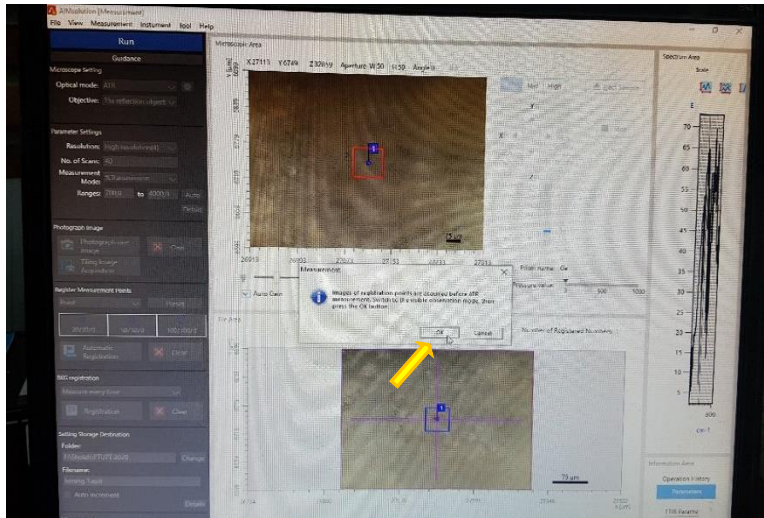
Gambar 33. Pengambilan gambar titik pada sampel yang akan diidentifikasi

21. Pada bagian “Setting Storage Destination”, pilih lokasi folder untuk menyimpan data, dan tuliskan nama file.



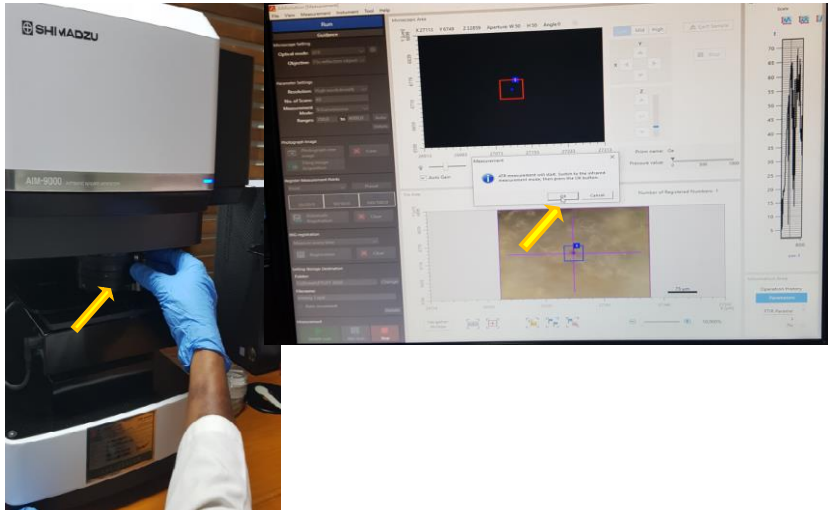
Gambar 34. Pengaturan penyimpanan data pengukuran

22. Klik fitur “Sample Scan” di bagian bawah.
23. Selanjutnya akan muncul notifikasi seperti yang ada di Gambar 35. Klik OK.



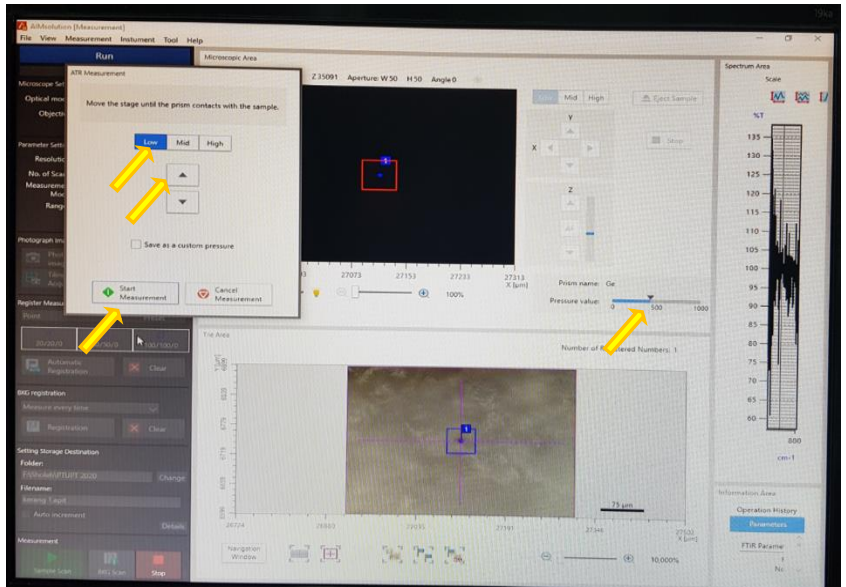
Gambar 35. Notifikasi untuk mengganti posisi ATR Objective sebelum melakukan pengukuran

24. Posisi ATR Objective dipindahkan dari mode visible observation menjadi mode measurement, dengan menarik tuas ATR Objective hingga bunyi klik sekali. Setelah itu notifikasi untuk memulai pengukuran menggunakan infra red akan muncul, klik OK.



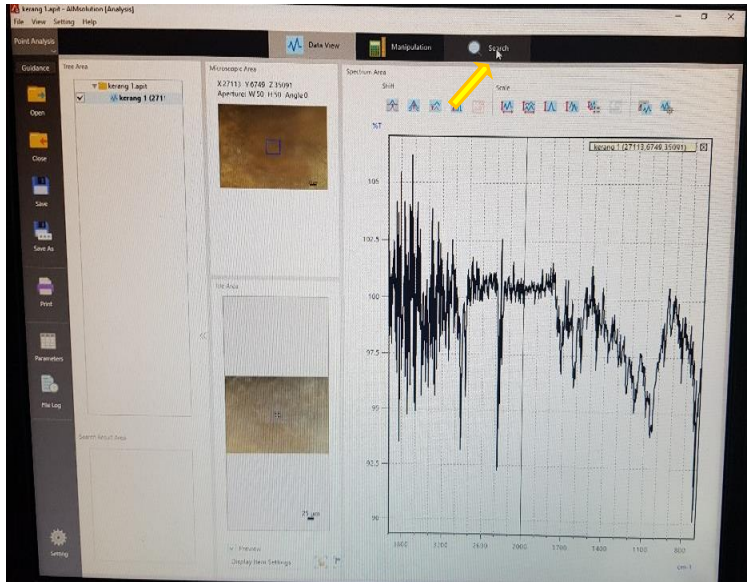
Gambar 36. Pemindahan posisi ATR Objective ke mode pengukuran

25. Setelah menunggu beberapa detik maka akan muncul instruksi tentang ATR Measurement. Sampel harus ditekan dengan prisma Ge, dengan cara mengklik tombol anak panah ke atas (disarankan untuk menggunakan kecepatan rendah – Low) hingga nilai tekanan mencapai hampir 500 (bar warna biru akan muncul hingga mendekati angka 500). Bila tekanan yang diberikan terlalu besar, maka bar indikator akan berubah dari biru menjadi kuning atau merah. Tidak disarankan bar indikator menjadi merah karena akan merusak prisma. Setelah itu klik “Start Measurement”.



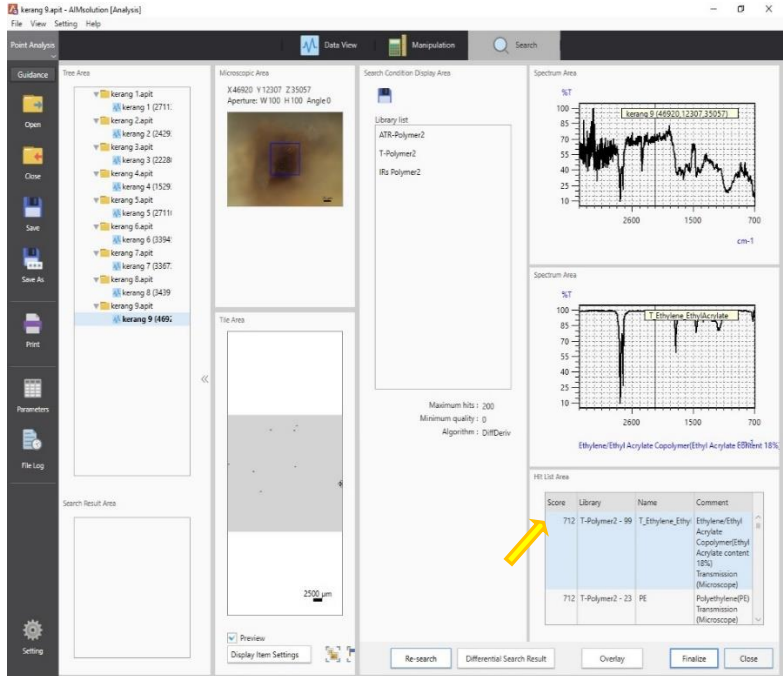
Gambar 37. Instruksi untuk menekan sampel dengan prisma Ge ATR

26. Setelah itu sampel akan discan 40 kali dan spektra transmisi akan muncul.
27. Secara otomatis program AIM Solution [Analysis] akan muncul untuk mencocokkan spektra sampel dengan spektra yang ada di library di database program. Klik "Search" dan pilih opsi database polymer pada library. hasil pencocokan spektra sampel dan database di library akan keluar.



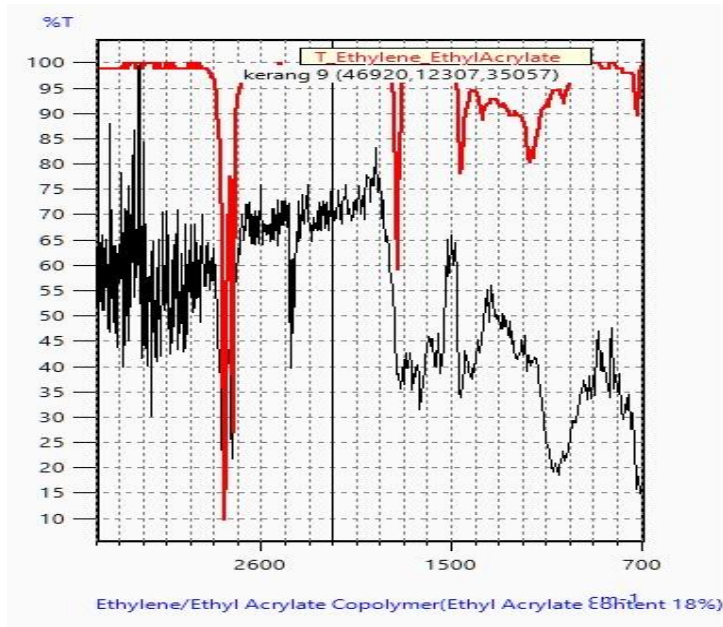
Gambar 38. Pencocohan spektra sampel dengan database yang ada di library program

28. Hasil identifikasi polimer dapat dilihat pada spektra dan skor kesamaan (Similarity Score) yang ada di bagian bawah. Pada bagian window sebelah kanan dimunculkan spektra sampel, spektra reference (dari database di library), dan skor kesamaan.



Gambar 39. Hasil pembacaan FTIR

Skor kesamaan maksimal adalah 1000, yang berarti hasil identifikasi mikroplastik (MP) sampel identik dengan polimer plastik pada database. Nilai skor yang paling atas adalah yang paling mendekati. Pada contoh di atas, disebutkan bahwa kemungkinan jenis polimer yang paling mendekati sampel adalah *ethylene ethyl acrylate* (EEA), dengan nilai skor 712.



Gambar 40. Spektra polimer EEA yang teridentifikasi dari sampel kerang

29. Untuk memastikan jenis polimer yang telah diidentifikasi, semakin mendekati skor 1000, tingkat kepasian jenis polimer semakin tinggi. Namun ada beberapa penelitian yang menetapkan batasan minimal skor yang berbeda-beda, antara lain skor >600 atau 60% (Hanachi et al. 2019), >700 atau 70% (Cho et al. 2019), >75% (Hossain et al. 2020) dan >80% (Koongolla et al. 2020).

30. Apabila skor tertinggi hasil identifikasi mikroplastik yang didapatkan kurang dari 800, maka disarankan untuk melakukan pengecekan pada spektra hasil, dimana *finger print* – dalam hal ini direpresentasikan dengan bilangan gelombang – yang menjadi marker polimer plastik yang diidentifikasi nampak pada spektra hasil.

REFERENSI

- Cho Y, Joon W, Jang M, Myung G, Hee S. 2019. Abundance and characteristics of microplastics in market bivalves from South Korea. *Environ Pollut* [Internet]. 245:1107–1116. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.091>
- Gago J, Filgueiras A, Pedrotti ML, Caetano M, Frias J. 2018. Standardised protocol for monitoring microplastics in seawater [Internet]. [place unknown]. Available from: <http://www.jpi-oceans.eu/baseman/main-page>
- Hanachi P, Karbalaee S, Walker TR, Cole M, Hosseini S V. 2019. Abundance and properties of microplastics found in commercial fish meal and cultured common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 26:23777–23787. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05637-6>
- Hossain MS, Rahman MS, Nasir M, Sharifuzzaman SM, Rahman S, Sarker S, Nawaz MS. 2020. Microplastic contamination in Penaeid shrimp from the Northern Bay of Bengal. *Chemosphere* [Internet]. 238:124688. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124688>
- Koongolla JB, Lin L, Pan Y, Yang C. 2020. Occurrence of microplastics in gastrointestinal tracts and gills of fish from Beibu Gulf, South China Sea. *Environ Pollut* [Internet]. 258:113734. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113734>

Li J, Yang D, Li L, Jabeen K, Shi H. 2015. Microplastics in commercial bivalves from China. *Environ Pollut* [Internet]. 207:190–195. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.018>

Waite HR, Donnelly MJ, Walters LJ. 2018. Quantity and types of microplastics in the organic tissues of the eastern oyster *Crassostrea virginica* and Atlantic mud crab *Panopeus herbstii* from a Florida estuary. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 129:179–185. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.026>

