

3. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2018 hingga Mei 2020. Sampel ikan bandeng diambil dari Tambak Lorok dan Tapak. Digesti dan pengamatan mikroplastik yang ditemukan pada jaringan pencernaan (*gastrointestinal tract* – GIT) ikan bandeng, air dan sedimen dilakukan di Laboratorium Ilmu Pangan dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan, Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.

3.2. Desain Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Pada penelitian pendahuluan dilakukan pemilihan metode destruksi yang dapat menghancurkan seluruh bagian GIT ikan bandeng, namun tidak merubah warna serta bentuk dari mikroplastik. Kemudian metode yang paling efektif digunakan untuk penelitian utama.

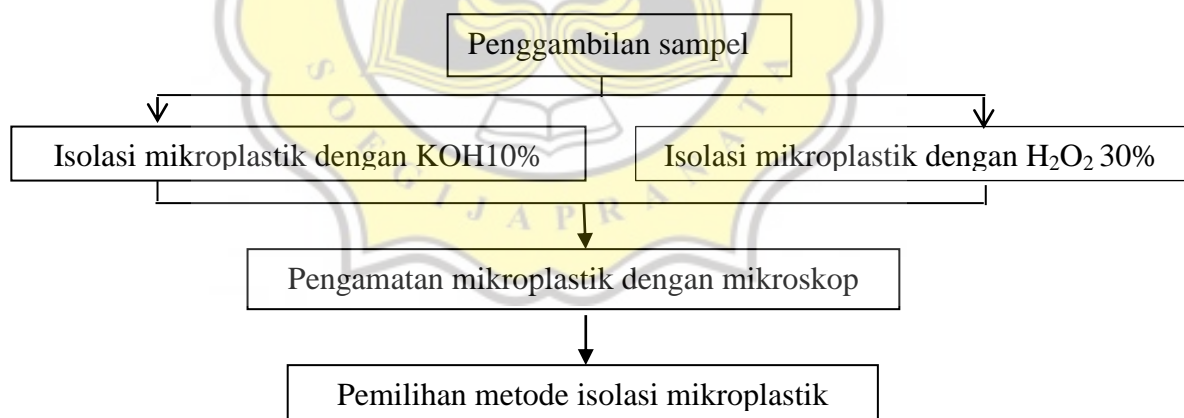
3.2.1. Desain Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari (2020) dan Christianto (2019). Pertama, dilakukan penambahan standar internal berupa mikroplastik berjenis *Low Density Polyethylene* (LDPE), *Poly Vinyl Chloride* (PVC), *Polypropylene* (PP), *Polystyrene* (PS). Standar internal ditambahkan untuk melihat pengaruh proses digesti terhadap beberapa parameter dalam standar internal yaitu *recovery*, perubahan panjang, perubahan keliling, perubahan luas, serta skor FTIR. Penelitian ini membandingkan penggunaan larutan KOH dan H₂O₂ dalam mendestruksi sampel.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Sari (2020), mikroplastik berjenis PVC mempunyai hasil *recovery* terbaik yaitu sebesar 88% . Sedangkan mikroplastik berjenis PP mempunyai hasil *recovery* terendah yaitu sebesar 36%. Digesti menggunakan pelarut KOH 10% pada suhu 50°C selama 5 hari merupakan kondisi yang optimal untuk mendigesti GIT ikan bandeng

Pada penelitian Christianto (2019), mikroplastik berjenis PVC mempunyai hasil *recovery* terbaik yaitu sebesar 100%. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak ada mikroplastik yang hilang selama proses analisa mikroplastik berlangsung. Sedangkan mikroplastik berjenis PP mempunyai hasil *recovery* terendah yaitu sebesar 70%. Selain itu partikel mikroplastik PP memiliki karakteristik transparan sehingga cukup sulit untuk teramati. Proses digesti *GIT* ikan bandeng dengan menggunakan larutan H₂O₂ 30% yang optimal dilakukan rasio perbandingan 1:10 (berat sampel : volume H₂O₂) pada suhu 65⁰C selama 24 jam. Proses digesti dengan H₂O₂ 30% pada suhu 65⁰C selama 24 jam tidak mempengaruhi ukuran dari polimer jenis PE, PP, dan PVC. Namun mengecilkan ukuran dari polimer jenis PS. Proses digesti dengan H₂O₂ 30% pada suhu 65⁰C selama 24 jam tidak mengubah spektra polimer PE, PP, PS, dan PVC.

Metode yang dipilih yaitu metode yang dapat menghancurkan seluruh bagian bandeng dan tidak merubah warna serta bentuk dari mikroplastik yang ditambahkan. Desain penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 3.



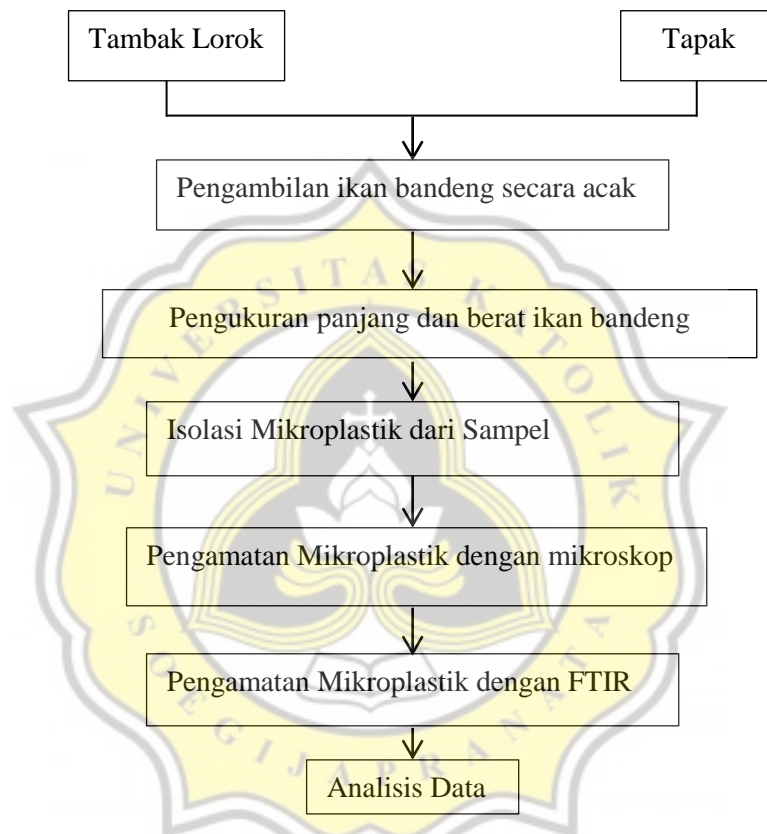
Gambar 3. Desain Penelitian Pendahuluan

3.2.2. Desain Penelitian Utama

Pengambilan sampel bandeng di Tambak Lorok dan Tapak dilakukan dengan metode *random sampling*. Selanjutnya, sebanyak 30 sampel bandeng dari masing – masing tambak diambil secara acak. Mikroplastik diisolasi dari sampel bandeng

yang sudah diketahui panjang dan beratnya. Mikroplastik yang diperoleh diidentifikasi morfologinya (warna, bentuk, ukuran panjang) dengan mikroskop. Identifikasi jenis plastik dalam ikan bandeng dilakukan dengan menggunakan mikro-FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) dengan menggunakan fitur ATR (*Attenuated Total Reflectance*).

Desain penelitian utama dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Desain Penelitian Utama

3.3. Materi

3.3.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah neraca analitik, jangka sorong, cawan petri, *dissection set*, *plankton net*, *van veen grab sediment*, erlenmeyer 250 mL, gelas arloji, kertas saring Whatman No 540 (ukuran pori 8 mikrometer), kertas saring Whatman No 541 (ukuran pori 22 mikrometer), pompa vakum Sartorius, neraca analitik, *magnetic stirrer*, *waterbath*, *shaker*, oven Binder,

mikroskop Olympus BX41, dan Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR) Shimadzu AIM 9000.

3.3.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ikan bandeng (*Chanos chanos*), aquades, aquabides steril merk IKA, larutan etanol 70%, larutan KOH 10% MERCK, larutan H₂O₂ 30% dari JT Baker, NaCl dari MERCK, potongan plastik (PE, PP, PS, HDPE, NY6 dan Polyester). Semua reagen kimia yang digunakan dalam penelitian memiliki spesifikasi *pro-analysis* (PA).

3.4. Metode

3.4.1 Penelitian Pendahuluan

3.4.1.1. Uji Pendahuluan dengan Standar Internal Mikroplastik

Uji Pendahuluan dengan Standar Internal Mikroplastik mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari (2020) dan Christianto (2019). Mikroplastik yang digunakan sebagai standar internal berjenis *Low Density Polyethylene* (LDPE), *Poly Vinyl Chloride* (PVC), *Polypropylene* (PP), *Polystyrene* (PS). Preparasi mikroplastik berjenis LDPE diambil dari produk *skincare* lulur Purbasari sebanyak 10 gram dengan cara dilarutkan dalam air hangat bersuhu 40⁰C sebanyak 750 ml dan didiamkan selama 24 jam hingga seluruh pasta terlarut. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No. 540, lalu dibilas dengan aquades. Selanjutnya, mikroplastik yang tertinggal dalam kertas saring dikeringkan pada suhu 50⁰C selama 24 jam.

Sampel partikel plastik (PE, PP, PS, dan PVC) diletakkan diatas *S.T. Japan Diamond EX'Press II cell* dan partikel ditekan hingga menjadi datar sehingga memaksimalkan sinar *infrared* yang diteruskan. Kemudian sampel diamati dengan mikroskop AIM 9000 Selanjutnya, dilakukan proses pembacaan spektrum mikroplastik dengan *scanning* sebanyak 40 kali. %*Transmittance* sampel dibandingkan dengan database polimer plastik.

3.4.1.2. Optimasi Destruksi Mikroplastik dengan Metode Alkali dan Hidrogen Peroksida

Optimasi destruksi mikroplastik dengan metode alkali dan hidrogen peroksida dilakukan untuk mendapatkan rasio antara massa sampel dan volume larutan yang digunakan agar mendapatkan hasil destruksi sampel yang sempurna. Metode destruksi menggunakan alkali diadopsi dari Karami et al. (2017). Pertama, dilakukan optimasi metode dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi KOH yang memiliki kemampuan destruksi paling baik dan berapa lama waktu destruksi yang dibutuhkan untuk menghancurkan seluruh jaringan GIT ikan bandeng. Penelitian ini diawali dengan menambahkan larutan KOH konsentrasi 10%, pada sampel ikan bandeng dengan perbandingan antara larutan KOH dengan berat ikan bandeng sebesar 10:1 dan 20: 1 (v/w). Selanjutnya, sampel ikan bandeng diinkubasi pada suhu 40°C hingga seluruh bagian GIT ikan bandeng terdestruksi sempurna.

Selama proses destruksi, setiap hari sampel diamati untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan untuk mendestruksi sempurna GIT ikan bandeng. Pada penelitian ini, destruksi GIT ikan bandeng selama 3 hari pada konsentrasi KOH yang bervariasi dapat menghancurkan GIT ikan bandeng dengan sempurna di hari ketiga.

Destruksi sampel menggunakan larutan hidrogen peroksida 30% mengacu pada Li et al. (2018) dan Waite et al (2018). Pertama, dilakukan optimasi metode dengan menginkubasi sampel GIT ikan bandeng menggunakan larutan H₂O₂ 30% dengan perbandingan antara larutan H₂O₂ dengan berat sampel sebesar 10:1 dan 20:1 (v/w) pada suhu 65°C selama 24 jam pada erlenmeyer yang ditutup rapat dengan gelas arloji. Setelah itu, sampel didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam.

Selama proses destruksi, setiap hari sampel diamati untuk mengetahui waktu yang dibutuhkan untuk mendestruksi sempurna GIT ikan bandeng. Pada penelitian ini, destruksi GIT ikan bandeng selama 3 hari pada konsentrasi H₂O₂ yang bervariasi dapat menghancurkan GIT ikan bandeng dengan sempurna di hari kedua.

Setelah membandingkan destruksi menggunakan metode alkali dan hidrogen peroksida. Kedua metode ini dapat menghancurkan seluruh GIT ikan bandeng. Namun destruksi menggunakan larutan KOH 10% membutuhkan waktu lebih lama jika dibandingkan destruksi menggunakan H₂O₂ 30%. Sehingga destruksi yang dipilih adalah destruksi dengan larutan H₂O₂ 30% (1:20) karena paling efektif dalam mendestruksi seluruh GIT ikan bandeng selama 1 hari dan hasil larutan destruksi yang jernih.

3.4.2. Penelitian Utama

3.4.2.1. Pengambilan Sampel Ikan Bandeng, Air dan Sedimen

Lokasi tambak bandeng berada di Tambak Lorok, dan Tapak Semarang. Pengambilan sampel dilakukan dengan berperahu, Setiap pengambilan sampel di masing-masing lokasi diukur salinitas, kedalaman, suhu, dan pH.

Ada beberapa lokasi pengambilan sampel di Tambak lorok yaitu di bagian tambak (1-5) dan di bagian laut (6-10) (Gambar 5).



Gambar 5. Lokasi Pengambilan Sampel di Tambak Lorok

Sedangkan lokasi pengambilan sampel di Tapak ada 3 bagian, yaitu sungai (1-5), tambak (6-10), dan laut (11-15) (Gambar 6).



Gambar 6. Lokasi Pengambilan Sampel di Tapak

Di sekitar lokasi tambak banyak sekali terdapat sampah plastik seperti sisa pembungkus makanan, kantong belanja, botol minum dan lain sebagainya (Gambar 7). Tambak lorok langsung berdekatan dengan pemukiman warga, sedangkan tapak berdekatan dengan pabrik. Air tambak berasal dari air laut.



Gambar 7. Sampah plastik di sekitar Tambak Lorok

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan bandeng (*Chanos chanos*). Sampel ikan bandeng (*Chanos chanos*) berukuran sedang dengan panjang $\pm 20 - 25$ cm (sekitar umur 4 bulan) diambil dari Tambak Lorok dan Tapak dengan cara *random sampling* yaitu teknik pengambilan sampel dari suatu tambak yang dilakukan secara acak. Pengambilan ikan bandeng dengan

menggunakan jala disepanjang tambak. Ada sekitar 50 sampel ikan bandeng yang diambil dari masing-masing tambak. Selanjutnya, sampel yang diperoleh dimasukkan dalam *cooler box* berisi es batu. Setelah itu, sampel disimpan dalam freezer (-19°C). Sebelum dianalisis, sampel didiamkan pada suhu ruang dalam kondisi tertutup hingga seluruh es mencair. Lalu dilakukan pembedahan (*dissection*) ikan bandeng, untuk mengambil bagian GIT.



Gambar 8. *Plankton Net*

Pengambilan air dengan menggunakan alat khusus yaitu *plankton net* (Gambar 8) berdiameter 20 cm (100 mesh). Pengambilan sampel air hanya di bagian permukaan, dengan cara memasukan *plankton net* ke dalam air lalu ditarik dengan kapal dengan jarak 100m dari titik pengambilan satu ke titik pengambilan lain (Frias et al. 2014; Chae et al. 2015; Syakti et al. 2017). Ada 15 titik pengambilan air di tambak lorok (Gambar 5), yakni 5 titik dari sungai, 5 titik dari tambak dan 5 titik dari laut. Sedangkan 10 titik yang diambil pada tapak yaitu 5 titik di tambak dan 5 titik di laut (Gambar 6). Kemudian hasil sampel air dimasukkan ke dalam botol kaca dan disimpan untuk dianalisis.



Gambar 9. *Van Veen Grab*

Pengambilan sedimen menggunakan alat pengambil sedimen (*van veen grab*) (Gambar 9) berbahan stainless steel yang dimasukkan ke dalam dasar tambak (Stock *et al* (2019). Hasil sampel sedimen dimasukkan ke dalam toples dan disimpan untuk dianalisis. Titik pengambilan sampel sedimen sama dengan titik pengambilan sampel air.

3.4.2.2. Pencegahan Kontaminasi (Lusher *et al.*, 2017a; Karami *et al.*, 2017)

Untuk mencegah terjadinya kontaminasi seluruh pelarut yang akan digunakan disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No 541. Selanjutnya, semua wadah yang akan digunakan dicuci dengan sabun pencuci piring komersial dan dibilas menggunakan aquabides. Kemudian, wadah dibilas lagi dengan larutan etanol 70% dan dikeringkan dengan oven. Semua wadah ditutup dengan aluminium foil untuk mencegah kontaminasi mikroplastik dari udara. Selama penelitian berlangsung diwajibkan untuk mengenakan jas lab katun 100%, sarung tangan nitril, dan masker. Selain itu juga disiapkan dua blanko dan dua kontrol udara setiap *batch* analisis sampel, yang bertujuan untuk mengetahui apakah ada kontaminan selama penelitian berlangsung. Blanko merupakan larutan yang mendapat perlakuan yang sama dengan sampel. Kontrol udara disiapkan dengan meletakkan kertas saring Whatman No. 541 pada ruangan mikroskop. Sampel blanko dan kontrol saat pengamatan mikroskop digunakan sebagai faktor koreksi untuk perhitungan akhir PSM dan penjaminan mutu selama analisis berlangsung. Penjaminan mutu analisis dilakukan untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi selama proses digesti.

3.4.2.3. Pengukuran Panjang dan Berat

Sebelum dilakukan dissection pada ikan bandeng, dilakukan penimbangan dan pengukuran panjang. Penimbangan berat menggunakan timbangan analitik. Sedangkan pengukuran panjang menggunakan jangka sorong. Kemudian *dissection* ikan untuk memperoleh bagian GIT. GIT kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik.

3.4.2.4. Destruksi menggunakan Larutan Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Destruksi sampel menggunakan larutan hidrogen peroksida 30% mengacu pada Li et al. (2018). Sampel GIT yang sudah diketahui beratnya dimasukkan ke tabung erlenmeyer 250 mL dan ditambah dengan larutan hidrogen peroksida 30% pada perbandingan antara larutan dengan sampel sebesar 20:1 (v/w) dan erlenmeyer ditutup rapat dengan gelas arloji. Sampel diinkubasi pada suhu 65°C selama 24 jam untuk mempercepat proses destruksi. Selanjutnya, sampel didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah itu, larutan disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman 540 kemudian dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer 250 mL.

Sampel ditambah dengan 250 mL larutan NaCl jenuh (1,2 g/cm³) dan dikocok secara manual untuk melepaskan mikroplastik dari kertas saring. Cara membuat Larutan NaCl jenuh yaitu dengan melarutkan 337 gram NaCl dalam 1 liter aquabides (Coppock et al., 2017). Sebelum digunakan, larutan NaCl disaring menggunakan kertas saring Whatman No 541. Setelah itu, larutan didiamkan pada suhu ruang selama 24 jam agar pemisahan mikroplastik dengan jaringan GIT ikan bandeng berjalan optimal. Selanjutnya larutan disaring dengan kertas saring Whatman No. 540. Lalu, kertas saring ini disimpan di cawan petri untuk dianalisis lebih lanjut.

3.4.2.5. Destruksi Sampel Air

Destruksi sampel air mengacu pada metode Gago *et al.*(2018). Sampel air disaring dengan saringan 100 µm. Kemudian bagian residu dikumpulkan dengan bantuan aquabides. Sedangkan bagian filtrat dikumpulkan di wadah lain. Selanjutnya,

masing-masing dari filtrat dan residu diproses dengan metode yang sama yaitu disaring dengan kertas saring Whatman 540. Kertas saring diletakkan di dalam gelas beker 200 ml dan ditambahkan KOH 10% dengan perbandingan sampel (berat kertas saring dan komponen organik di atasnya) dan KOH adalah 1:50 (w/v). Selanjutnya sampel diinkubasi pada oven dengan suhu 40 °C selama 72 jam.

Jika belum terdestruksi sempurna, ditambahkan H₂O₂ 15% dengan perbandingan berat sampel dan H₂O₂ 1:1(w/v) (berat sampel yang digunakan adalah berat sampel bersama KOH). Lalu diinkubasi pada suhu 40 C selama 24 jam. Setelah itu disaring menggunakan kertas saring Whatman 540. Kertas saring dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan larutan NaCl 1,2 gr/cm³ sebanyak 250 ml. Kemudian digoyang menggunakan *shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 165 rpm dan didiamkan selama satu jam. Lalu sampel disaring menggunakan kertas saring Whatman 540 dan diamati dibawah mikroskop, kemudian diidentifikasi jenis polimernya menggunakan FTIR.

3.4.2.6. Destruksi Sampel Sedimen

Destruksi sedimen mengacu pada metode Yu *et al.*(2016). Sampel sedimen dikeringkan dengan oven pada suhu 60 °C selama 3 hari. Kemudian sampel sedimen dihaluskan menggunakan mortar dan disaring menggunakan saringan dengan ukuran pori 5mm. Sebanyak 10 gram sedimen yang sudah diayak, ditambahkan dengan 150ml larutan H₂O₂ 30%. Setelah itu diinkubasi dalam oven suhu 65⁰ C selama 24 jam. Kemudian sampel ditambahkan 250 ml larutan NaCl (1,2gr/cm³) dan didiamkan selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, cairan supernatan disaring. Kertas saring yang mengandung partikel kemudian dengan direndam dalam 100ml larutan NaCl, dan goyangkan menggunakan *shaker* selama 1 jam dengan kecepatan 165 rpm. Setelah itu, sampel di saring menggunakan kertas saring Whatman 541. Kertas saring tersebut lalu diamati dengan mikroskop dan dilanjutkan dengan FTIR.

3.4.2.7. Deteksi dan Identifikasi Mikroplastik

Kertas saring hasil dari penyaringan kemudian diamati dengan mikroskop perbesaran 40x dan 100x. Pengamatan mikroskop meliputi bentuk, warna dan ukuran mikroplastik. Identifikasi bentuk partikel PSM mengacu pada bentuk mikroplastik menurut Free et al. (2014).

Identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui jenis polymer plastik menggunakan *Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (ATR-FTIR). Jenis prisma yang digunakan yaitu Germanium (Ge) dengan resolusi spektrum yang digunakan sebesar 8 cm^{-1} . Kisaran spektrum diatur antara 700 cm^{-1} dan 4000 cm^{-1} . Spektrum diperoleh dengan *optical mode: Attenuated Total Reflectance* (ATR) dan *measurement mode: % Transmission* dalam 40 kali pembacaan. Identifikasi jenis polimer diperoleh dengan membandingkan karakteristik spektrum inframerah sampel dengan *database* (IRs Polymer2, ATR-Polymer2, dan T-Polymer2) dari software AIMSolutions (Hidalgo-Ruz et al., 2012). Jenis polimer ditentukan dengan membandingkan tingkat kemiripan antara spektrum inframerah pada sampel dan spektrum referensi (Dris et al., 2018)

3.4.2.8. Analisis Data

Dari hasil pengamatan mikroplastik menggunakan mikroskop, dihasilkan data berupa jumlah, warna, bentuk dan panjang mikroplastik. Kemudian data itu disajikan ke dalam bentuk tabel dan grafik untuk mengetahui proporsi sampel ikan bandeng yang tercemar mikroplastik dan jenis mikroplastik tersebut. Dari jumlah mikroplastik yang didapatkan dilakukan pengelompokan berdasarkan ukuran dibawah $20\text{ }\mu\text{m}$, $20 - 50\text{ }\mu\text{m}$, $50 - 100\text{ }\mu\text{m}$, $100 - 1000\text{ }\mu\text{m}$, dan diatas $1000\text{ }\mu\text{m}$.

Terdapat dua nilai koreksi yang digunakan dalam penelitian ini. Yang pertama, jumlah PSM (*Particle Suspected as Microplastic*) pada sampel ikan bandeng dikurangi dengan rata – rata blanko sebagai nilai koreksi keberadaan kontaminan selama proses destruksi berlangsung. Yang Kedua, jumlah PSM yang ditemukan dikurangi dengan rata – rata blanko dan rata - rata kontrol udara di ruang mikroskop. Rata – rata kontrol udara di ruang mikroskop diperoleh dari rata – rata

dua kontrol udara yang disediakan saat melakukan pengamatan per hari, kemudian dibagi dengan jumlah sampel yang diamati pada hari tersebut.

Nilai Terkoreksi 1 = Total PSM sampel – Avg PSM Blanko

Nilai Terkoreksi2 = Total PSM sampel – Avg PSM Blanko – $\frac{\text{Avg PSM Kontrol Udara}}{\Sigma \text{ sampel yang diamati}}$

Keterangan : Avg adalah *Average* (Rata-rata)
Satuan dalam partikel

Dari hasil pengamatan dengan ATR-FTIR, didapatkan data berupa jenis polimer mikroplastik dengan skor atau tingkat kemiripan antara spektrum sampel dengan spektrum referensi yang bervariasi. Menurut Lusher (2013), identifikasi polimer dapat diterima jika sampel yang diuji memiliki kemiripan spektra lebih dari 60% dari spektra standar (*database*). Sedangkan menurut Carreras-Colom et al.,(2018) dan Li et al.,(2018), partikel yang memiliki skor atau tingkat kemiripan spektrum dengan referensi lebih dari 700 merupakan partikel yang dapat dianggap mirip dengan jenis polimer mikroplastik.

