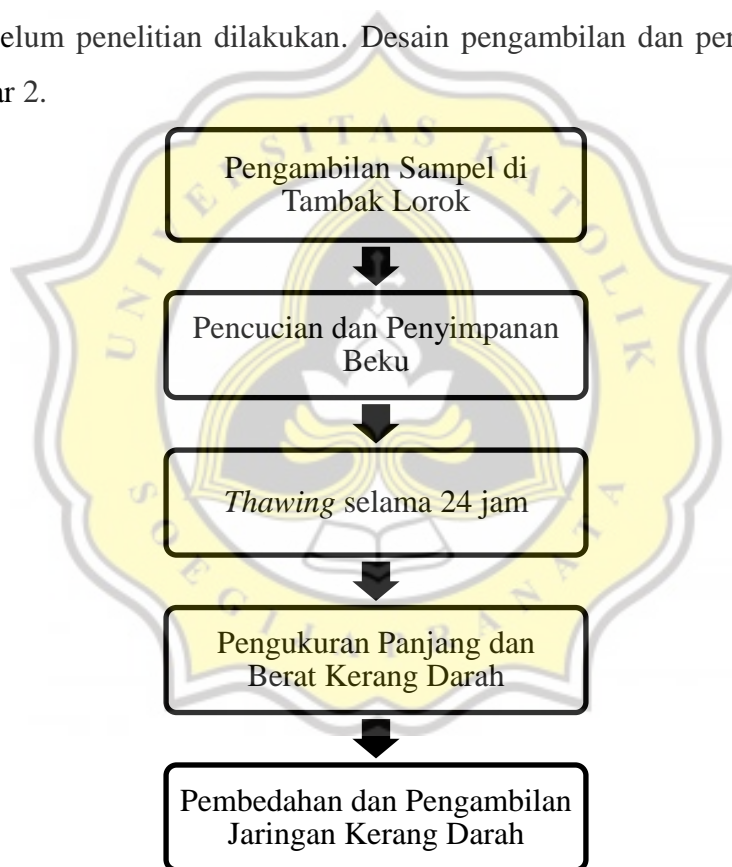


3. MATERI DAN METODE

3.1. Desain Penelitian

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada bulan April 2019 dan penelitian utama dilaksanakan bulan Mei sampai Juni 2020 di Laboratorium Rekayasa Pengolahan Pangan, Ilmu Pangan, dan Mikrobiologi Universitas Katolik Soegijapranata Semarang. Penelitian pendahuluan dan utama diawali dengan pengambilan sampel kerang darah di Tambak Lorok Semarang dengan bantuan nelayan setempat. Sampel yang diperoleh kemudian dicuci dan disimpan didalam kaleng dan dibekukan di *freezer* suhu -17°C . Sampel kemudian dilunakkan kembali di refrigerator suhu 3°C selama 24 jam sebelum penelitian dilakukan. Desain pengambilan dan persiapan sampel dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Desain Pengambilan dan Persiapan Sampel

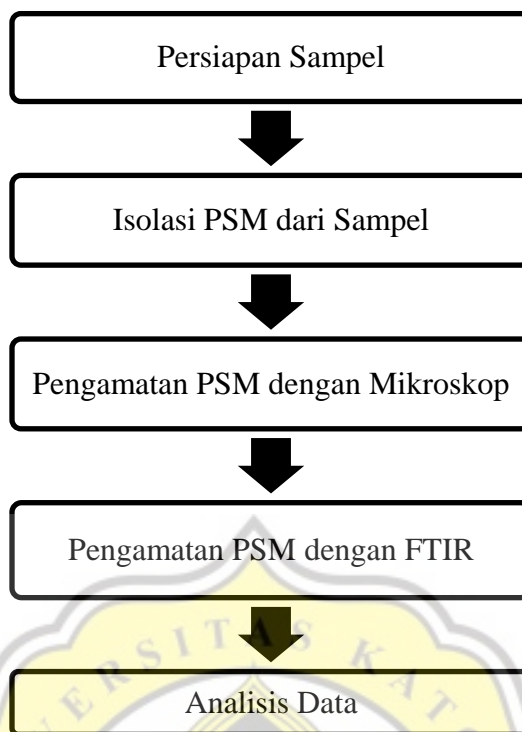
Tambak Lorok Semarang adalah sumber dari kerang darah yang dijual di pasar - pasar kota Semarang. Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menemukan metode destruksi yang sesuai untuk kerang darah. Optimasi metode destruksi menggunakan larutan basa KOH 10% dan

larutan asam H_2O_2 30% kemudian dibandingkan larutan hasil destruksinya. Desain penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Desain Penelitian Pendahuluan

Hasil destruksi yang terbaik kemudian digunakan untuk penelitian utama. Penelitian utama dimulai dengan pengambilan sampel pada 2 lokasi berbeda di bulan April dan Mei 2019. Jumlah sampel yang digunakan untuk penelitian utama adalah 30 ekor kerang darah per lokasi. Hasil PSM (*particle suspected as microplastics*) yang ditemukan kemudian di amati dibawah mikroskop dan diidentifikasi jenis plastiknya dengan FTIR. Desain penelitian utama dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Desain Penelitian Utama

3.2. Materi

3.2.1. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian pendahuluan antara lain kerang darah (*Anadara granosa*), *microbeads* lulur Purbasari, aquabidest, etanol 96%, larutan KOH 10%, larutan NaI 4.4M. Sedangkan pada penelitian utama, bahan-bahan yang digunakan antara lain kerang darah (*Anadara granosa*), sedimen dan air dari habitat kerang darah, aquabidest, etanol 96%, larutan H₂O₂ 30%, larutan NaCl 1,2 gram/cm³, *aluminium foil*, kertas saring Whatman No 540 ukuran pori 8 µm, Whatman No 541 ukuran pori 22 µm. Semua reagen yang digunakan dalam penelitian memiliki spesifikasi proanalisis (PA).

3.2.2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain pisau bedah, pinset, talenan kayu, erlenmeyer 250 ml, timbangan analitik, aluminium foil, oven Binder, corong kaca, jangka sorong digital, pompa pilleus, pipet ukur, pengaduk, sarung tangan nitril, masker, kaca preparat, cawan petri, *Van Veen Grab Sediment, water sampler*, dan mikroskop Olympus BX-4, *freezer*, pompa vakum Sartorius, dan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) AIM 9000 Shimadzu*.

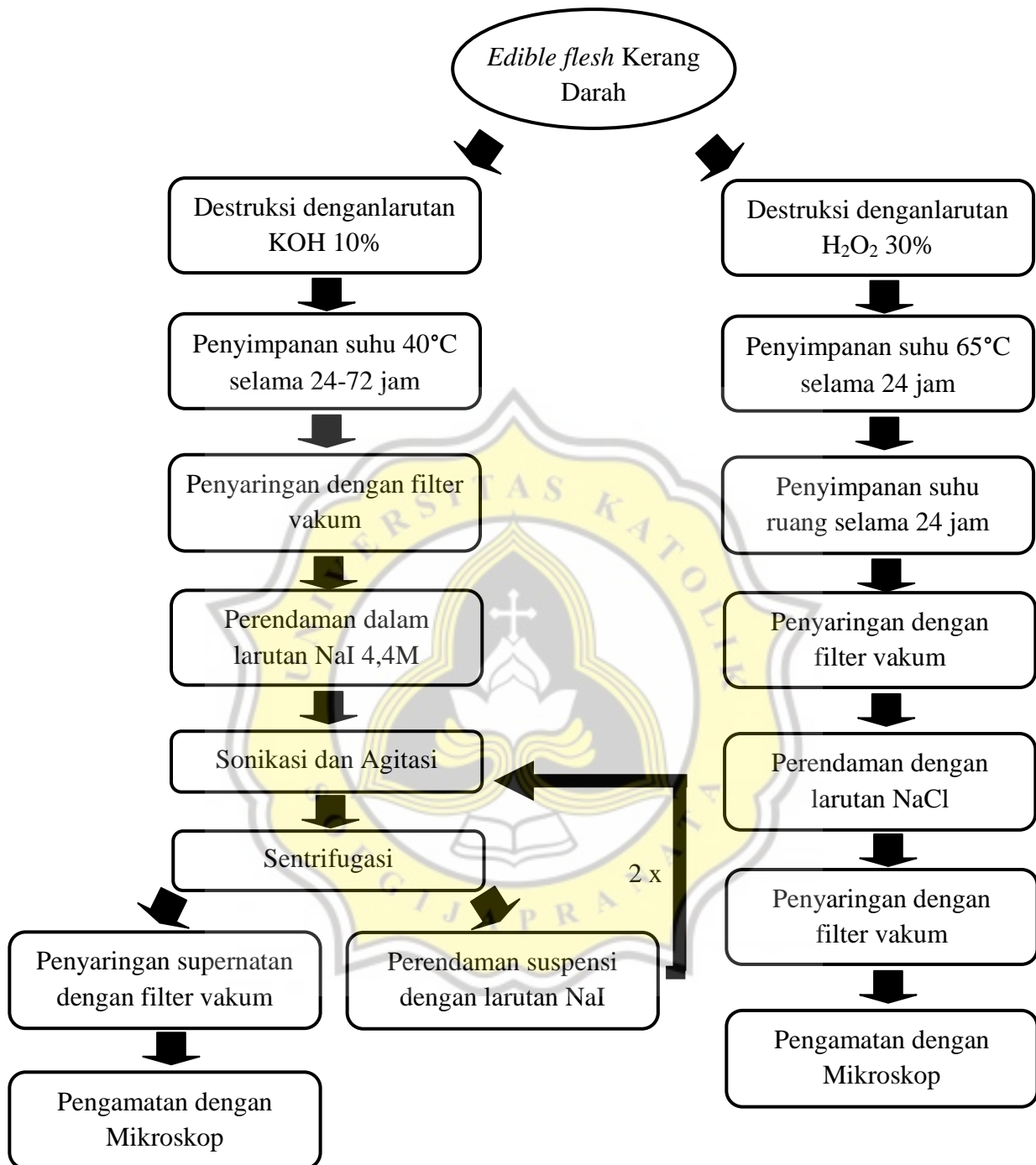
3.3. Metode

3.3.1. PenelitianPendahuluan

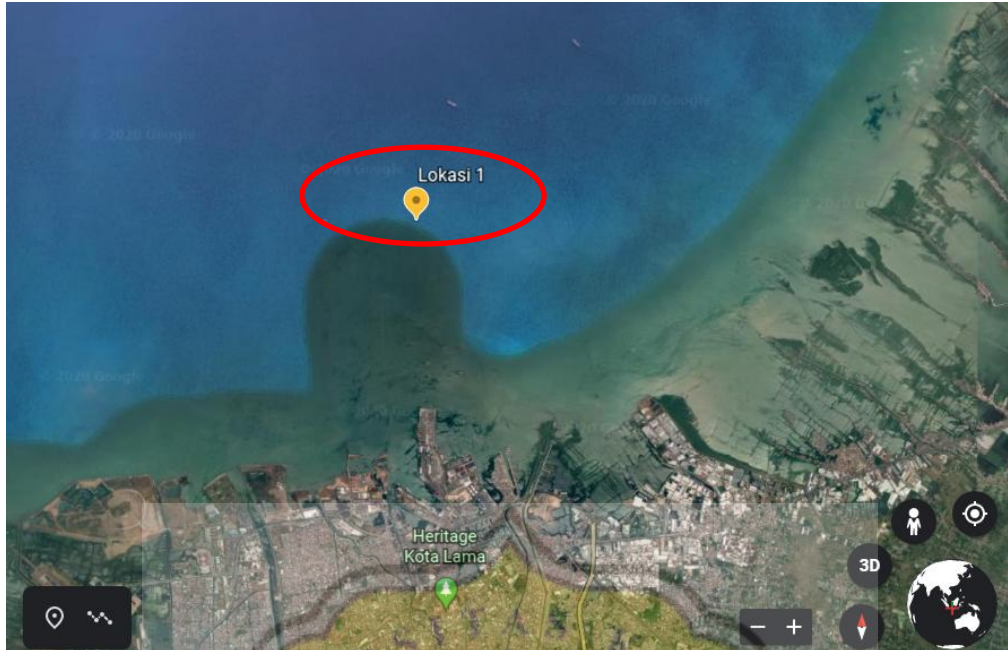
Uji pendahuluan dilakukan untuk memperoleh metode destruksi yang paling sesuai untuk digunakan pada penelitian utama. Pengambilan sampel dilakukan di Tambak Lorok Semarang pada 27 April 2019. Sampel yang sudah melalui tahapan persiapan sampel (Gambar 2) kemudian didestruksi dengan larutan asam dan basa. Metode destruksi dengan larutan basa KOH 10% mengacu pada Karami *et al.* (2017), sedangkan metode destruksi dengan larutan asam H₂O₂ 30% mengacu pada Li *et al.* (2015) dan Waite *et al.* (2018). Diagram alir penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 5. Metode destruksi yang akan dipilih untuk penelitian utama harus dapat menghancurkan seluruh jaringan kerang darah, tanpa merusak atau merubah bentuk dan warna mikroplastik yang ditemukan.

- **Pengambilan Sampel**

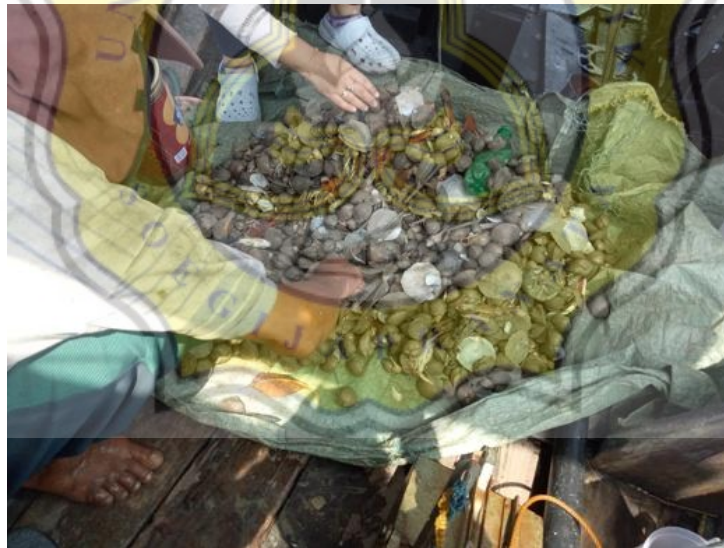
Sampel kerang darah diambil dari Pesisir Pantai Tambak Lorok Semarang pada koordinat 6°54'23"S 110°25'23"E. Gambar lokasi pengambilan sampel melalui Google Earth dapat dilihat di Gambar 6. Pengambilan sampel dibantu oleh nelayan dengan menggunakan kapal berpengeruk (*dredge*) dan jala. Jala yang sudah terisi akan diangkat dan kemudian kerang darah dipisahkan dari material maupun organisme lain (Gambar 7). Sesaat setelah diambil, kerang darah tersebut dicuci dengan air mengalir, dibilas dengan akuabides, dan disimpan didalam wadah kaleng kemudian disimpan dalam *freezer* suhu -17°C. Apabila akan digunakan, sampel di-*thawing* dalam wadah tertutup di refrigerator suhu 3°C selama kurang lebih 24 jam.



Gambar 5. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan



Gambar 6. Lokasi Pengambilan Sampel untuk Penelitian Pendahuluan



Gambar 7. Pemisahan Kerang Darah dari Material dan Organisme Lain

- **Persiapan Alat dan Bahan**

Semua peralatan yang akan digunakan dibilas terlebih dahulu dengan menggunakan akuabides steril dan etanol (96%). Setelah itu peralatan dibungkus dengan *aluminium foil* dan dikeringkan dalam oven suhu 40⁰C. Selain persiapan alat, seluruh bahan yang akan digunakan disiapkan

sesaat sebelum penelitian dan seluruh larutan sudah disaring secara vakum dengan kertas saring Whatman No. 541 untuk mengurangi kontaminasi.

- **Pembuatan Larutan KOH 10% dan H₂O₂ 30%**

Pembuatan larutan ini dilakukan dengan menimbang KOH proanalysis sebanyak 100 gram, kemudian KOH ditambahkan akuabides steril sebanyak 1000 ml. Setelah itu dilakukan pengadukan sampai KOH terlarut sempurna, kemudian disaring dengan filter vakum. Untuk larutan hidrogen peroksida proanalysis 30% merek J.T. Baker hanya dilakukan penyaringan dengan filter vakum karena sudah merupakan larutan yang sesuai.

- **Persiapan Referensi Mikroplastik untuk Standar Internal**

Referensi mikroplastik untuk standar internal menggunakan *microbeads* yang ada pada lulur merek Purbasari. *Microbeads* ini sudah diketahui dan dikonfirmasi secara resmi terbuat dari plastik *polyethylene* (PE) sesuai dengan klaim di label yang tertera pada kemasan lulur. Untuk standar internal plastik jenis PP dilakukan diambil dari gelas air mineral, PS diambil dari gabus, dan PVC diambil dari pralon PVC yang digergaji untuk menghasilkan serbuk. Penelitian mengenai standar internal ini dilakukan oleh Gracella Handoyo dan Steven Caprileo dalam skripsi tahun 2019 yang tidak dipublikasikan. Hasil dari penelitian tersebut adalah tidak ada perbedaan secara visual antara mikroplastik yang ditambahkan 10 ml KOH 10% dengan mikroplastik yang ditambahkan 10 ml larutan H₂O₂ 30%. Identifikasi mikroplastik dengan *diamond cell S.T. Japan EX'Press II* dari micro-FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) IR Tracer 100 yang dilengkapi mikroskop AIM 9000 dari Shimadzu juga menunjukkan dan sesudah ditambahkan larutan pendestruksi, tidak ada perubahan pada jenis mikroplastik.

- **Destruksi Organ Kerang Darah dengan Larutan KOH 10%**

Metode destruksi sampel dengan larutan alkali KOH 10% diadopsi dari Karami *et al.* (2017). Persiapan detruksi dimulai dengan pengukuran panjang cangkang dan penimbangan berat kerang utuh. Kemudian setelah itu dilakukan pembedahan untuk mengambil seluruh organ kerang tersebut. Organ utuh yang sudah diambil kemudian ditimbang dan diletakkan pada erlenmeyer. Masing – masing organ kemudian ditambahkan larutan KOH 10% dengan

perbandingan berat organ dengan volume larutan 1:10(w/v) dan diinkubasi pada suhu 40°C serta dilakukan pemeriksaan visual dilakukan setiap 24 jam.

Setelah terdestruksi dengan sempurna, dilakukan penyaringan dengan filter vakum dan kertas saring yang digunakan (Whatman No. 540) direndam dalam 10 ml larutan NaI 4,4 M kemudian disonikasi pada suhu 50 Hz selama 5 menit diikuti dengan agitasi pada shaker (200 rpm) selama 5 menit. Cairan kemudian disentrifugasi pada 500×g selama 2 menit, dan supernatan dikumpulkan dalam botol. Untuk memastikan pemisahan mikroplastik yang terjebak dalam partikel tulang, suspensi direndam kembali dalam larutan NaI 10 ml, dilakukan sonikasi dan agitasi, kemudian disentrifugasi seperti yang dijelaskan sebelumnya. Proses ini dilakukan total tiga kali. Supernatan yang terkumpul kemudian disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 541 kemudian dikeringkan dalam oven 60°C selama 24 jam.

- **Destruksi Organ Kerang Darah dengan Larutan H₂O₂ 30%**

Metode destruksi sampel dengan larutan H₂O₂ 30% mengacu pada Li *et al.* (2015) dan Waite *et al.* (2018). Jaringan lunak dari setiap ekor kerang darah dilarutkan dalam larutan H₂O₂ 30% dengan perbandingan 1:10, disimpan pada erlenmeyer bertutup dan diinkubasi 24 jam pada suhu 65°C. Setelah itu, inkubasi dilanjutkan pada suhu ruang selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, dilakukan penyaringan dengan kertas saring Whatman 540 dengan filter vakum. Kertas saring yang digunakan untuk menyaring tersebut kemudian ditambahkan 250 ml larutan garam jenuh NaCl 1,2 g/cm³ dan didiamkan selama 24 jam supaya partikel mikroplastik bisa mengambang. Penyaringan dilakukan kembali menggunakan kertas saring Whatman 541 dan kertas saring tersebut kemudian diamati dibawah mikroskop.

- **Pengamatan *Particle Suspected as Microplastic* (PSM) dengan Mikroskop**

Hasil destruksi kemudian diamati dibawah Mikroskop Olympus BX-41 dengan perbesaran 40x atau 100x. Bentuk, warna, dan ukuran PSM yang terlihat di mikroskop dicatat. Bentuk PSM yang ditemukan kemudian dibandingkan dengan hasil penelitian milik Rochman, *et al.* (2015) yang tertera pada Tabel 4. Dari hasil penelitian pendahuluan, akan diperoleh perbandingan tingkat kelarutan jaringan dan jumlah mikroplastik yang ditemukan dari kedua larutan. Larutan yang paling optimal dalam mendestruksi akan digunakan untuk penelitian utama.

3.3.2. Penelitian Utama

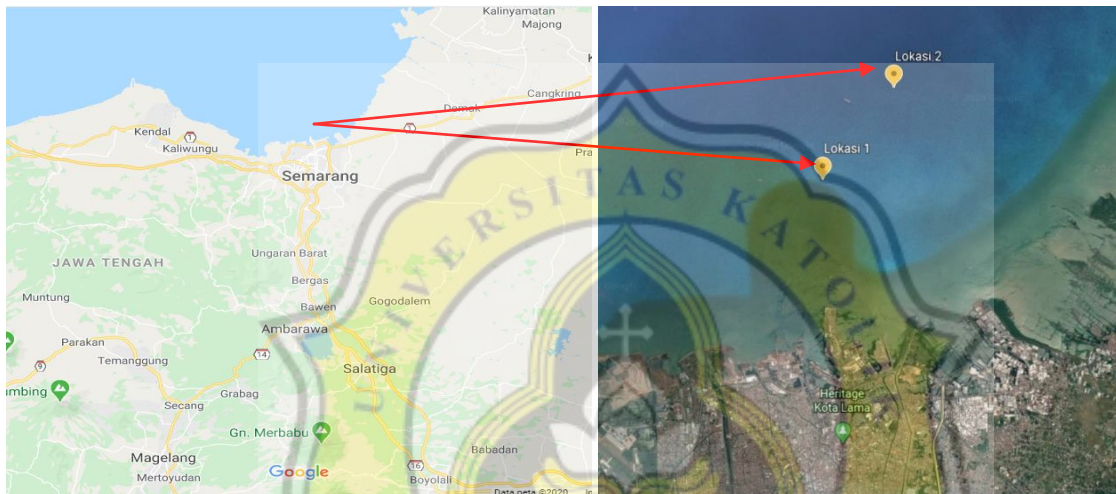
Penelitian utama diawali dengan pengambilan sampel di lokasi yang merupakan habitat kerang darah. Lokasi pengambilan sampel ditunjukkan oleh Gambar 9. Penelitian utama menggunakan metode yang sudah diuji di penelitian pendahuluan yaitu berdasarkan metode dari Li *et al.* (2015) dan Waite *et al.* (2018). Diagram alir penelitian utama dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Analisis Mikroplastik pada Kerang Darah

- **Pengambilan Sampel**

Pengambilan sampel dilakukan 2 kali yaitu tanggal 27 April 2019 dan 25 Mei 2019 menggunakan transportasi kapal nelayan sehingga bisa mencapai titik yang merupakan habitat kerang darah. Lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 9. Pengambilan sampel pertama tanggal 27 April 2019 ditandai dengan Lokasi 1 berada pada koordinat koordinat $6^{\circ}54'23''\text{S}$ $110^{\circ}25'23''\text{E}$, sedangkan pengambilan sampel kedua pada 25 Mei 2019 ditandai dengan Lokasi 2 berada pada koordinat $6^{\circ}53'05''\text{S}$ $110^{\circ}26'24''\text{E}$.



Gambar 9. Lokasi Pengambilan sampel Air, Sedimen, dan Kerang Darah
(Sumber : Google Maps dan Google Earth)

Saat sudah mencapai titik yang dituju maka dilakukan pengambilan kerang darah dengan penggaruk dan jala (Gambar 10). Saat baru saja diambil, jala penuh dengan kerang darah dan berbagai macam material maupun organisme lain. Oleh karena itu, kerang darah kemudian dipisahkan dari material dan organisme lain secara manual dan material berupa plastik disimpan secara terpisah (Gambar 11). Kerang darah yang sudah terkumpul dimasukkan dalam *coolbox* yang berisi es batu. Kerang darah yang sudah dikumpulkan kemudian dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah dan lumpur yang menempel. Setelah dicuci, kerang darah diletakkan dalam kaleng dan disimpan di dalam *freezers* suhu -17°C . Sebelum digunakan untuk penelitian, kerang darah di-*thawing* selama 24 jam didalam refrigerator suhu 3°C .



Gambar 10. Nelayan Menarik Jala yang Berisi Kerang Darah dan Material Lain



Gambar 11. Material Plastik yang Diperoleh Bersama Kerang Darah: (a) Lokasi 1, (b) Lokasi 2

Pengambilan sampel sedimen dilakukan dengan menggunakan alat Van Veen Grab Sediment. Alat ini disambung menggunakan tali sepanjang dalamnya dasar perairan. Dokumentasi saat pengambilan sedimen dapat dilihat pada Gambar 12. Sedimen yang sudah diambil kemudian dimasukkan kedalam wadah tertutup dan disimpan di suhu ruang sampai saat akan digunakan.

Pengambilan sampel air laut menggunakan alat *water sampler*. Sampel air diambil dari 3 jenis kedalaman air laut yaitu 1 meter yang mewakili air permukaan, 4 meter, dan 8 meter yang mewakili dasar laut. Air yang sudah terkumpul dimasukkan kedalam jerigen dan ditutup rapat.

Penyimpanan sampel air dilakukan di refrigerator suhu 3°C sampai pada saat akan digunakan untuk penelitian. Dokumentasi saat pengambilan sampel air dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 12. Pengambilan Sampel Sedimen



Gambar 13. Pengambilan Sampel Air Laut

- **Pencegahan Kontaminasi dan Pengendalian Mutu Analisis**

Seluruh peralatan yang akan digunakan dibilas dengan akuabides steril dan metanol (99,98%), kemudian dibungkus aluminium foil dan dikeringkan di oven suhu 50⁰C. Seluruh larutan dibuat saat akan digunakan dan disaring vakum dengan kertas saring Whatman 541. Pada saat bekerja dilaboratorium, peneliti menggunakan sarung tangan nitril, masker, dan jas laboratorium katun 100%. Selain itu, dipersiapkan juga larutan blanko dan kertas saring Whatman 42 untuk kontrol udara. Tujuan dari larutan blanko dan kontrol udara adalah untuk mengetahui jumlah dan tipe kontaminan selama penelitian. Larutan blanko dibuat dengan perlakuan sama tetapi tidak terdapat sampel didalamnya (Huang, *et al.*, 2020).

- **Destruksi Organ Kerang Darah**

Kerang darah beku yang sudah dilunakkan kembali (*thawing*) ditimbang berat kotor per ekor. Setelah ditimbang, dilakukan pengambilan *edible flesh* dan kemudian dilakukan penimbangan untuk *edible flesh* tersebut. *Edible flesh* dari setiap ekor kerang darah dilarutkan dalam larutan H₂O₂ 30%, disimpan pada erlenmeyer bertutup dan diinkubasi 24 jam pada suhu 65°C. Setelah 24 jam, inkubasi dilanjutkan pada suhu ruang selama 24 jam.

Setelah inkubasi selesai, dilakukan penyaringan dengan kertas saring Whatman 540 dengan filter vakum. Kertas saring yang digunakan untuk menyaring tersebut kemudian ditambahkan larutan garam jenuh NaCl 1.2 g/cm³ dan didiamkan selama 24 jam supaya partikel mikroplastik bisa mengambang. Penyaringan dilakukan kembali menggunakan kertas saring Whatman 541 dan kertas saring tersebut kemudian diamati dibawah mikroskop. Setelah diamati dengan mikroskop, dilakukan identifikasi jenis plastik dengan FTIR Shimadzu. Diagram alir destruksi organ kerang darah dapat dilihat pada Gambar 14.



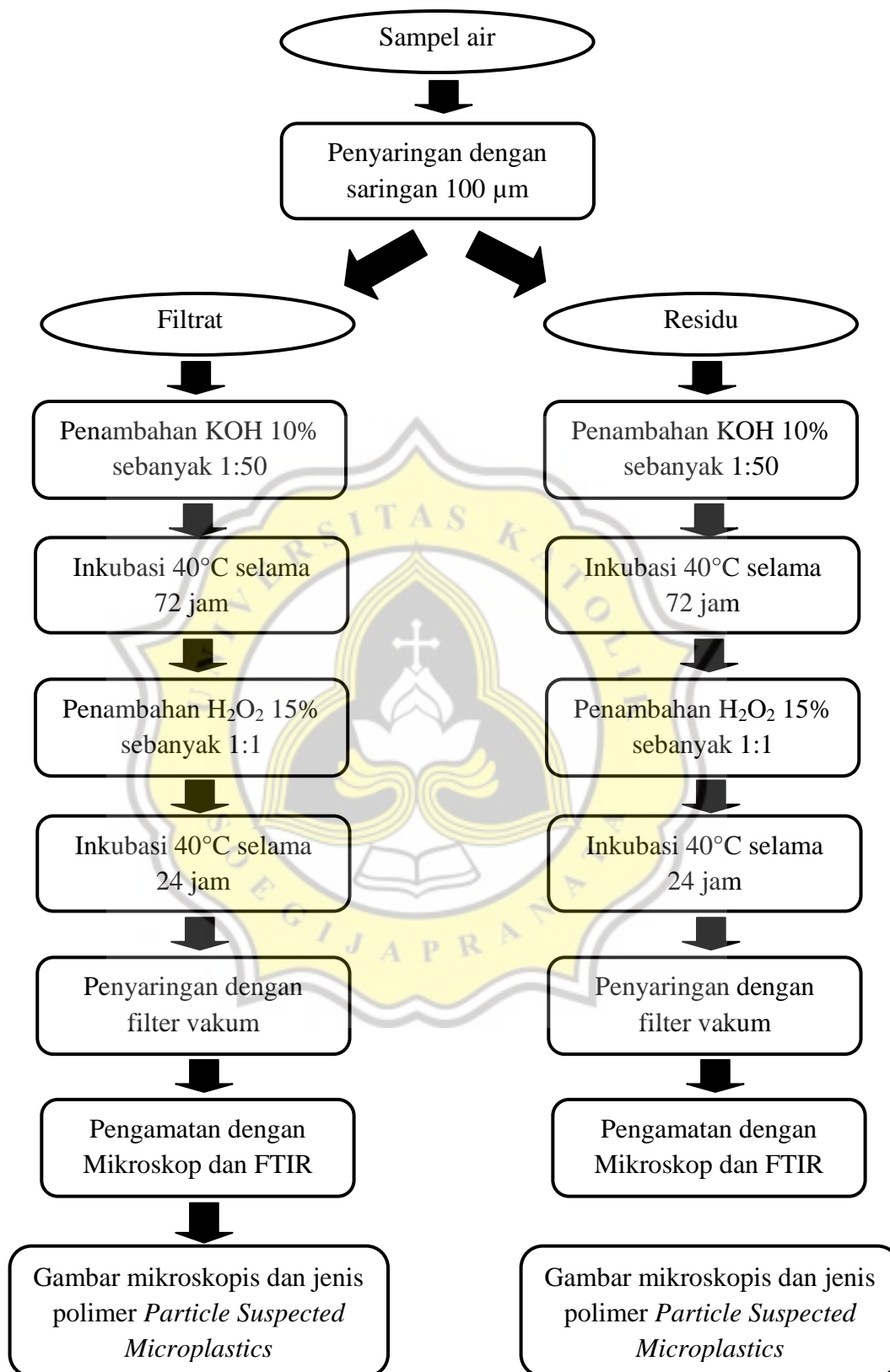
Gambar 14. Diagram Alir Penelitian Utama Destruksi Organ Kerang Darah

- **Ekstraksi *Particle Suspected as Microplastic* (PSM) pada Air Laut**

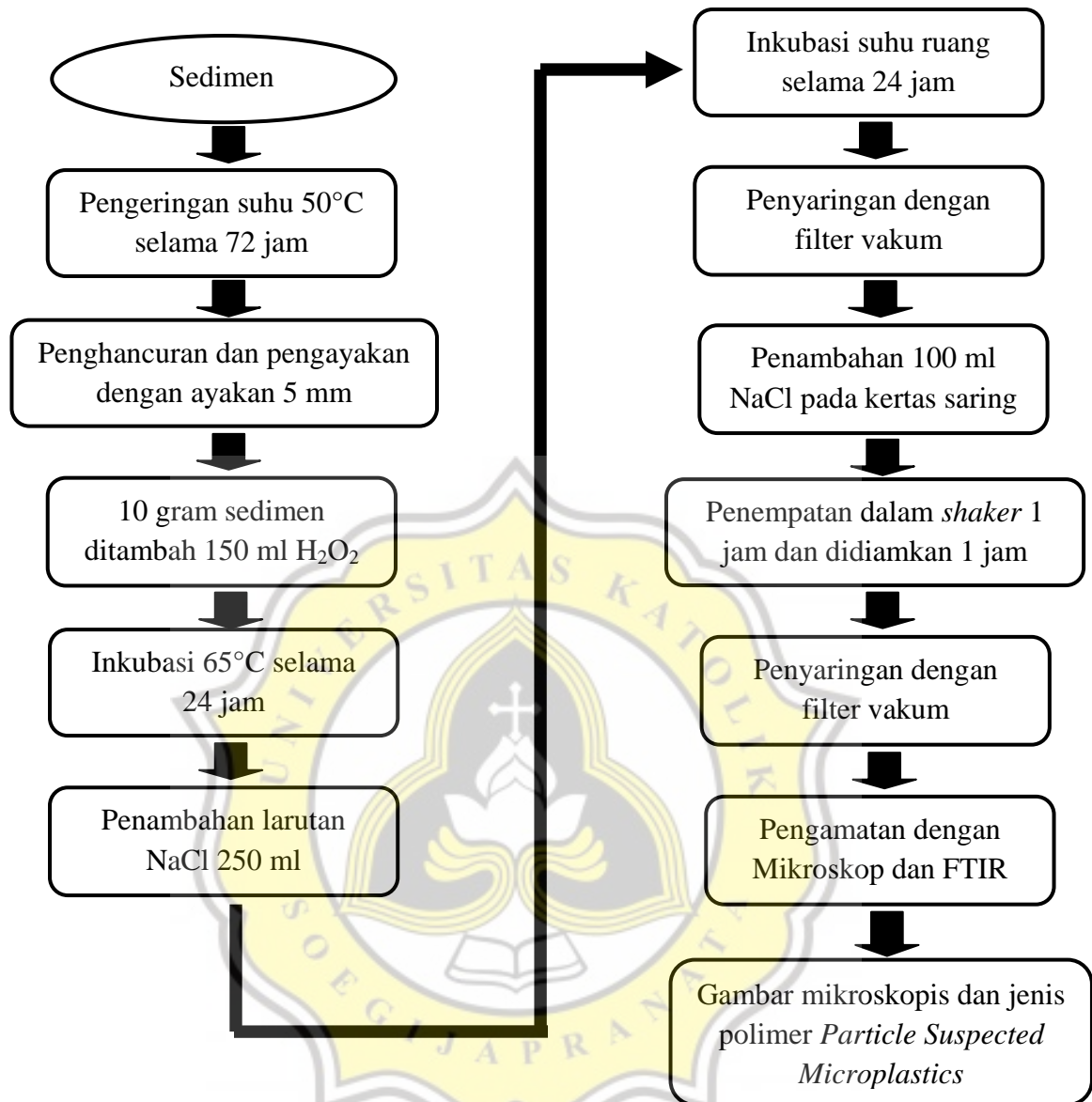
Metode ini mengacu pada penelitian oleh Gago *et al.* (2018). Sebanyak 1 liter sampel air disaring menggunakan saringan *stainless steel* dengan ukuran pori 100 mikrometer. Residu dan filtrat dikumpulkan secara terpisah kemudian masing – masing dilakukan langkah penyaringan. Penyaringan dilakukan dengan filter vakum menggunakan kertas saring Whatman 540. Berat kertas saring dan sampel kemudian ditimbang dan ditambahkan larutan KOH 10% dengan perbandingan berat sampel (kertas saring dan komponen organik di atasnya) dan larutan KOH adalah 1:50 (w/v). Sampel diinkubasi dalam oven 40°C selama 72 jam. Jika belum terdestruksi dengan sempurna maka ditambahkan H₂O₂ 15% dengan perbandingan berat sampel (dengan larutan KOH) dan larutan H₂O₂ adalah 1:1 (w/v). Sampel diinkubasi dalam oven 40°C selama 24 jam. Setelah inkubasi selesai, penyaringan kembali dilakukan dengan filter vakum dan kertas saring Whatman 540. Kertas saring tersebut kemudian diamati dibawah mikroskop kemudian diidentifikasi jenis plastiknya menggunakan FTIR Shimadzu. Diagram alir ekstraksi PSM ditampilkan pada Gambar 15.

- **Ekstraksi *Particle Suspected as Microplastic* (PSM) pada Sedimen**

Metode ekstraksi ini mengacu pada penelitian oleh Yu *et al.* (2016). Sampel sedimen dikeringkan di oven dengan suhu 60°C selama 3 hari atau sampai kering. Sedimen kering kemudian dihaluskan dengan mortar dan diayak di saringan *stainless steel* dengan ukuran pori 5mm. Sebanyak 10 gram sedimen yang sudah diayak ditambahkan larutan H₂O₂ 30% sebanyak 150 ml kemudian diinkubasi 65°C selama 24 jam. Inkubasi dilanjutkan 24 jam lagi di suhu ruang setelah ditambahkan 250ml larutan NaCl 1.2gr/cm³. Setelah inkubasi selesai, supernatan disaring dengan filter vakum dan kertas saring Whatman 540. Kertas saring yang mengandung partikel kemudian direndam dalam 100 ml larutan NaCl 1.2gr/cm³ serta diletakkan di *shaker* dengan kecepatan 165 rpm selama 1 jam. Setelah didiamkan 1 jam, dilakukan penyaringan vakum kembali dengan kertas saring Whatman 541. Kertas saring tersebut kemudian diamati dibawah mikroskop dan diidentifikasi partikel plastiknya dengan FTIR. Diagram alir ekstraksi PSM pada sedimen dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 15. Diagram Air Ekstraksi PSM pada Sampel Air Laut



Gambar 16. Diagram Air Ekstraksi PSM pada Sampel Sedimen

- **Identifikasi *Particle Suspected as Microplastic* (PSM)**

Kertas saring hasil destruksi kerang darah dan ekstraksi air serta sedimen kemudian diamati dibawah mikroskop Olympus BX-41 pada perbesaran 40x atau 100x untuk mencari keberadaan PSM. PSM yang ditemukan kemudian dicatat jumlah, ukuran, bentuk, dan warnanya. Bentuk PSM dicocokkan dengan temuan Rochmanet *al.* (2015) pada Tabel 3. Setelah pengamatan dengan mikroskop selesai, dilakukan identifikasi jenis PSM dengan ATR-FTIR (*Attenuated*

Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy) AIM 9000 Shimadzu dengan ketentuan *measurement mode: % Transmission 40 scans* (pembacaan), resolusi spektrum 8cm^{-1} , rentang spektrum 700 cm^{-1} dan 4000 cm^{-1} . Alat ATR-FTIR ini bekerja dengan cara membandingkan karakteristik spektrum inframerah sampel dengan *database* polimer dari *software* AIMSolutions. Spektrum infra merah sampel diperoleh ketika prisma yang terbuat dari Germanium (Ge) ini menempel ke sampel dan sampel merefleksikan kembali sinar infra merah tersebut ke prisma (Fu *et al.*, 2020).

Spektrum infra merah yang dihasilkan spektrum kemudian dibandingkan dengan *database* polimer plastik yang sudah tercatat kemudian akan dinilai kesamaannya (*similarity*). Nilai *similarity* terdiri dari 3 angka dan apabila semakin mendekati nilai 1000 (100%) maka jenis plastik sampel semakin sesuai dengan *database* referensi polimer yang tercatat. Penggolongan nilai kemiripan dibagi menjadi 3 yaitu 500-599, 600-699, dan diatas 700. Pada penelitian ini, partikel sampel dengan minimal nilai kemiripan dengan referensi 600 (*matching score* $\geq 60\%$) dipercaya sebagai polimer plastik sesuai dengan penelitian oleh Hanachi *et al.* (2019).

- **Analisa Data**

Hasil pengamatan PSM pada kerang darah, air laut, dan sedimen di mikroskop ditampilkan dalam bentuk foto. Sedangkan hasil identifikasi jumlah, bentuk, warna, ukuran, dan jenis PSM ditampilkan secara deskriptif dalam bentuk tabel, grafik, dan diagram. Selama penelitian di laboratorium, pencegahan kontaminasi sudah dilakukan semaksimal mungkin. Akan tetapi, untuk memastikan adanya kontaminan atau tidak, larutan blanko dan kertas saring untuk kontrol udara tetap digunakan. Hasil perhitungan jumlah PSM dari mikroskop dikurangi rata – rata jumlah PSM blanko dan rata – rata jumlah PSM dari kontrol udara adalah hasil akhir terkoreksi yang ditampilkan dalam hasil pengamatan.

Nilai Terkoreksi 1 = Total PSM sampel – Avg PSM Blanko

Nilai Terkoreksi 2 = 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

Satuan yang digunakan untuk temuan mikroplastik di kerang darah adalah partikel per organisme dan partikel per berat basah. Satuan partikel per organisme diperoleh dengan menghitung rata-rata partikel dari sejumlah sampel yang digunakan (30 sampel per lokasi), sedangkan untuk satuan partikel per berat basah diperoleh dengan menghitung rata-rata jumlah partikel dan membaginya dengan rata-rata berat basah per ekor kerang darah. Untuk temuan mikroplastik pada air laut, satuan yang digunakan adalah partikel per liter dan partikel per ml. Sedangkan pada sedimen, satuan yang digunakan adalah partikel per gram berat kering karena sedimen telah mengalami proses pengeringan dengan oven. Karena sampel yang digunakan adalah 10 gram, maka rata-rata jumlah partikel yang ditemukan dibagi dengan 10.

