

2. MATERI DAN METODE

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 18 Agustus – 27 November 2015. Pembuatan larutan *buffer* pencernaan manusia serta pengujian konsentrasi logam berat dilakukan secara *in vitro* di Laboratorium Ilmu Pangan, Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.

2.2. Materi

- **Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pH meter, termometer, *waterbath*, Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) “Perkin Elmer 3100”, botol kaca, pipet volum, pipet tetes, pompa pilleus, timbangan analitik, pisau, *juicer* “Philips HR-1886”, *hotplate* “Yellow Line Yellow Mag HS-10”, *magnetic stirrer*, *blender* “Philips HR-2115”, *moisture balance* “Ohaus MB-45”, *vortex* “Thermo”, labu ukur 100 ml, erlenmeyer, *teflon destruction bomb*, kertas saring, kain saring dan *oven* “Memmert”.

- **Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 32 kg buah jeruk keprok yang belum matang dari Pasar Johar Semarang, pektin komersil “Unipectine” dari Cargill, NaHCO₃ padat, CH₃COOH pekat, HCl 32%, HCl 37%, *aquades*, HNO₃ 65%, larutan induk kadmium 1000 ppm, CuSO₄ padat, PbCl₂, etanol 96%, NaCl, dan AgNO₃.

2.3. Metode

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, yakni: ekstraksi pektin dari bahan ampas jeruk keprok dan dilanjutkan dengan uji penyerapan logam oleh pektin dalam sistem *in vitro*. Pada tahap ekstraksi bahan, terlebih dahulu dilakukan persiapan bahan dan larutan, serta pemberian perlakuan pendahuluan. Perlakuan pendahuluan yang diberikan pada ampas jeruk keprok adalah pengeringan dengan oven bersuhu 55°C. Uji penyerapan logam dalam sistem *in vitro* juga dibagi ke dalam dua tahap, yaitu: penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Untuk mengukur banyaknya logam yang terserap pada sistem *in vitro*, dilakukan pengukuran kadar logam dengan menggunakan SSA.

2.4. Persiapan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah buah jeruk keprok (*Citrus nobilis*). Bahan diperoleh dari Pasar Johar, Semarang. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jeruk keprok yang belum matang, tidak busuk, kulit tidak cacat, dan berukuran seragam (Gambar 2). Bahan yang digunakan sebanyak 32 kilogram buah jeruk keprok, yang diambil dari peti yang sama. Bahan yang digunakan kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan dengan kain. Selanjutnya jeruk keprok dikupas dan dipisahkan buahnya. Buah kemudian diiris dan dihancurkan dengan menggunakan *juicer* sebanyak tiga kali, hingga diperoleh ampas buah jeruk yang bebas dari sari buah jeruk. Diagram alir tahapan proses disajikan pada Gambar 3.



Gambar 2. Penampakan Jeruk Keprok



Gambar 3. Preparasi Bahan Baku

Bahan yang telah disiapkan, kemudian diberi perlakuan pendahuluan (Gambar 4). Terdapat tiga jenis perlakuan pendahuluan yang diberikan pada ampas buah jeruk keprok, yaitu: ampas buah segar tanpa diberi perlakuan sebagai kontrol (pektin jeruk A, PJA), ampas buah kering oven 55°C selama 5 jam (pektin jeruk B, PJB), dan ampas buah kering oven 55°C selama 10 jam (pektin jeruk C, PJC). Untuk mengetahui perbedaan kadar air dari setiap perlakuan, dilakukan pengukuran kadar air dengan menggunakan *moisture balance* selama 30 menit. Pengukuran kadar air dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.



Gambar 4. Perlakuan Pendahuluan Bahan Baku

2.5. Persiapan Larutan

- **Pembuatan *Buffer* Pencernaan (Park *et al.*, 2005)**

Pembuatan larutan *buffer* sebagai pengganti cairan sistem pencernaan pada sistem *in vitro* berdasarkan metode Park *et al.* (2005) dengan menggunakan modifikasi. Untuk membuat larutan *buffer* pencernaan ini, mula-mula dibuat larutan *buffer sodium bicarbonated*. Sebanyak 950 ml larutan NaHCO₃ 0,5 M (42 gram NaHCO₃ dalam 1 liter aquades) dicampur dengan 90 ml CH₃COOH 0,75 M, kemudian divortex hingga diperoleh larutan *buffer sodium bicarbonated* yang homogen. Selanjutnya, sebanyak 67,5 gram padatan natrium klorida (NaCl) ditimbang dan ditambahkan ke dalam 1,04 liter *sodium bicarbonated buffer*. Larutan *buffer* pencernaan yang terbentuk, dihomogenkan dengan vortex hingga diperoleh larutan yang homogen. Selanjutnya, dilakukan pengukuran pH pada larutan. Jika pH larutan bersifat basa, dilakukan penambahan HCl 1 N hingga diperoleh *buffer* dengan pH sebesar 6,8.

- **Pembuatan Larutan Logam Berat**

- **Larutan Pengencer (SNI 06-6989.6-2004; SNI 06-6989.8-2004; SNI 6989.16:2009)**

Larutan pengencer digunakan untuk mengencerkan larutan logam. Larutan pengencer dibuat dengan mencampurkan *aquades* dengan asam nitrat pekat. Penambahan asam nitrat dilakukan hingga diperoleh larutan homogen dengan $\text{pH} \leq 2$. Larutan yang digunakan dalam mengencerkan larutan logam ini adalah HNO_3 dengan konsentrasi 0,012 N. Sedangkan untuk mengencerkan logam yang berbentuk padatan, digunakan larutan HNO_3 yang lebih pekat, yakni dengan konsentrasi 0,1 N.

- **Larutan Logam Kadmium (Cd) (SNI 6989.16:2009)**

Pada penelitian ini digunakan larutan logam Cd dengan konsentrasi 400 ppm. Mula-mula, diambil 40 ml larutan induk kadmium 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Selanjutnya ditambahkan larutan pengencer hingga mencapai tanda tera dan dihasilkan larutan Cd 400 ppm. Sedangkan sebagai larutan kalibrasi, digunakan larutan Cd dengan tiga konsentrasi yang berbeda. Larutan yang digunakan sebagai larutan kalibrasi S_1 , S_2 dan S_3 berturut-turut memiliki konsentrasi 0,1 ppm, 0,5 ppm dan 1,0 ppm.

- **Larutan Logam Tembaga (Cu)**

Pada penelitian ini digunakan larutan logam Cu dengan konsentrasi 200 ppm. Mula-mula, dibuat larutan 1000 ppm dengan melarutkan 2,51 gram padatan CuSO_4 dengan larutan HNO_3 0,1 N dalam labu takar 1000 ml, hingga mencapai tanda tera. Selanjutnya, diambil 20 ml larutan Cu 1000 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Setelah itu, larutan pengencer ditambahkan hingga mencapai tanda tera dan dihasilkan larutan Cu 200 ppm. Sedangkan sebagai larutan kalibrasi, digunakan larutan Cu dengan tiga konsentrasi yang berbeda. Larutan yang digunakan sebagai larutan kalibrasi S_1 , S_2 dan S_3 berturut-turut memiliki konsentrasi 0,1 ppm, 0,5 ppm dan 1,0 ppm.

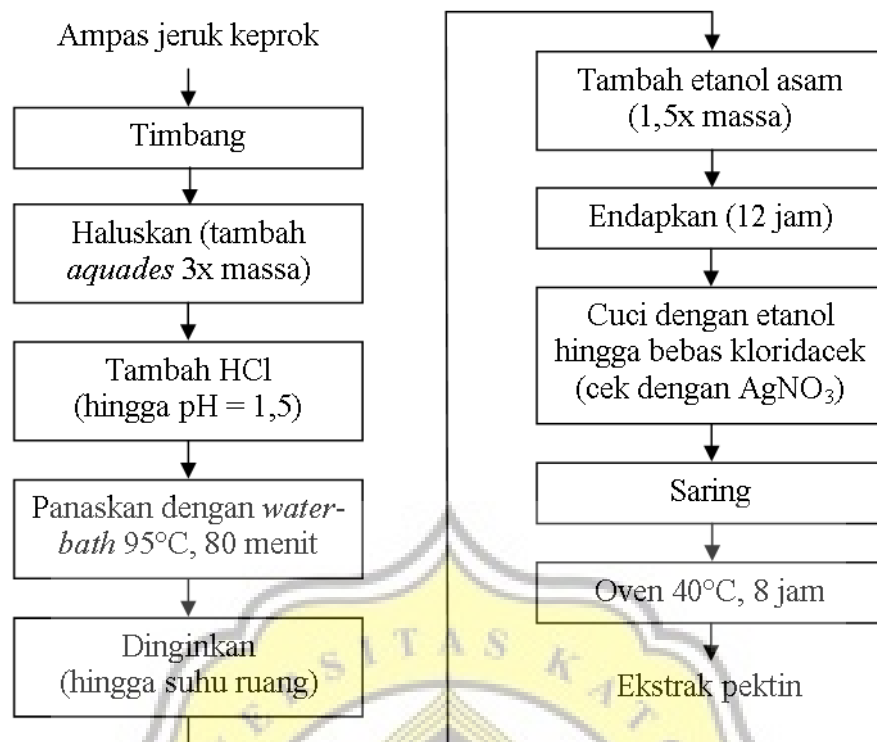
- **Larutan Logam Timbal (Pb)**

Pada penelitian ini digunakan larutan logam Pb dengan konsentrasi 100 ppm. Mula-mula, dibuat larutan 500 ppm dengan melarutkan 0,67 gram padatan PbCl_2 dengan

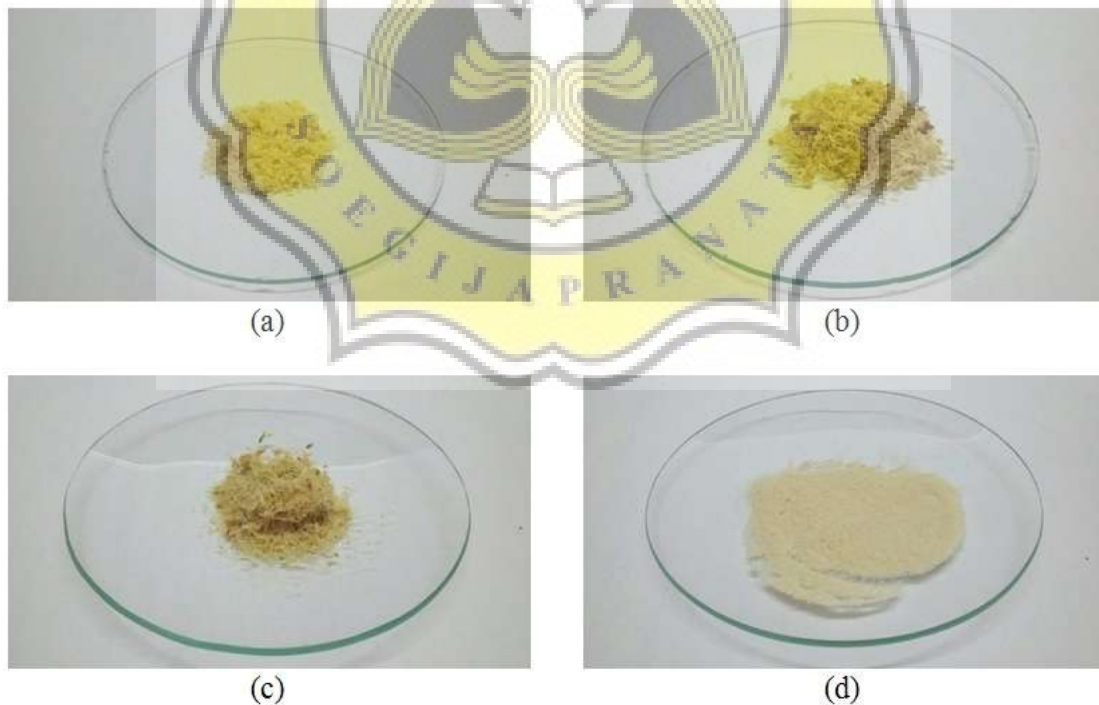
larutan HNO_3 0,1 N dalam labu takar 1000 ml, hingga mencapai tanda tera. Selanjutnya, diambil 20 ml larutan Pb 500 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Setelah itu, larutan pengencer ditambahkan hingga mencapai tanda tera dan dihasilkan larutan Pb 100 ppm. Sedangkan sebagai larutan kalibrasi, digunakan larutan Pb dengan tiga konsentrasi yang berbeda. Larutan yang digunakan sebagai larutan kalibrasi S_1 , S_2 dan S_3 berturut-turut memiliki konsentrasi 0,1 ppm, 0,5 ppm dan 1,0 ppm.

2.6. Ekstraksi Pektin (Hariyati, 2006 modifikasi)

Untuk mengekstrak pektin dari bahan ampas buah jeruk keprok, mula-mula bahan ditimbang dan dihancurkan dengan *blender*. Pada penghalusan ukuran bahan ini, dilakukan penambahan aquades sebanyak 3 kali massa bahan dan dihaluskan selama lebih kurang dua menit. Selanjutnya dilakukan pengaturan pH pada bubur ampas buah jeruk keprok dengan penambahan HCl 1 N hingga tercapai pH 1,5. Setelah itu, dilakukan pemanasan selama 80 menit dengan suhu 95°C , hingga dihasilkan bubur yang lebih kental. Bubur yang masih bersuhu tinggi ini kemudian didinginkan hingga mencapai suhu ruang, sebelum dilanjutkan ke tahapan berikutnya. Setelah suhu bubur menurun, dilakukan pengendapan pektin dengan penambahan etanol 96% yang telah diasamkan (1 liter etanol 96% ditambah dengan 2 ml HCl 32%) sebanyak 1,5 kali massa bubur. Bubur pektin diendapkan selama kurang lebih 12 jam, hingga nampak adanya endapan pektin di permukaan wadah. Endapan yang terbentuk kemudian dipisahkan dengan kain saring. Endapan pektin hasil penyaringan kemudian dicuci dengan menggunakan etanol 96% dengan bantuan kain saring hingga diperoleh gumpalan pektin yang bebas klorida. Sebagai indikator keberadaan klorida, dapat ditetaskan larutan AgNO_3 pada larutan sisa pencucian. Jika masih terdapat klorida, maka akan terbentuk endapan putih AgCl . Apabila ekstrak pektin sudah tidak mengandung klorida, selanjutnya dapat ditiriskan dari larutan pencuci dengan cara diperas dalam kain saring. Setelah itu, ekstrak pektin basah dapat dikeringkan dengan oven selama 8 jam pada suhu 40°C . Tahapan proses ekstraksi dan pektin yang dihasilkan disajikan pada Gambar 5 dan 6 di bawah ini.



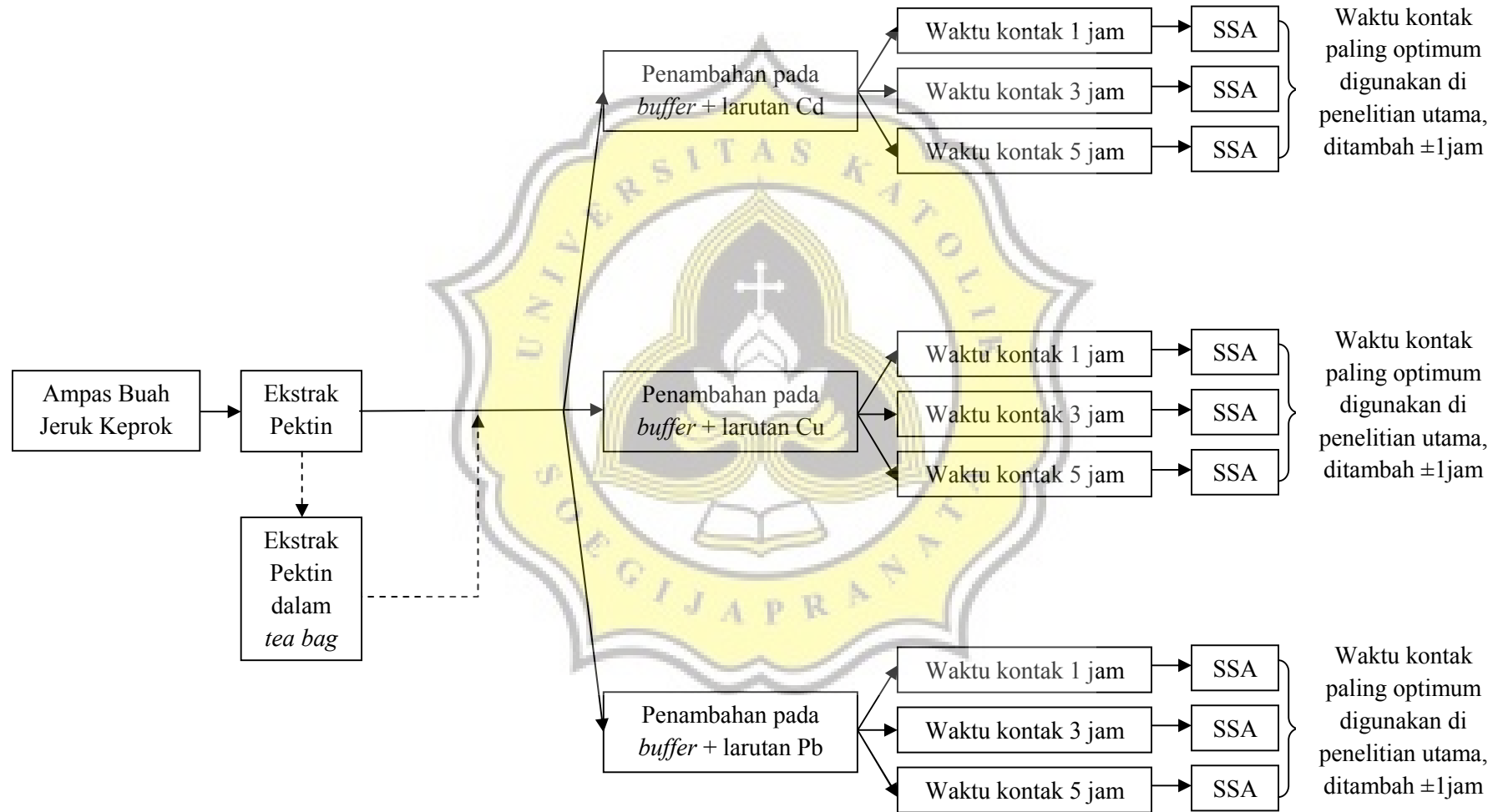
Gambar 5. Ekstraksi Pektin



Gambar 6. Pektin dari Ampas Jeruk : (a) PJA; (b) PJB; (c) PJC; dan (d) Pektin komersil

2.7. Penelitian Pendahuluan

Berikut merupakan gambar desain penelitian pendahuluan:



Gambar 7. Desain Penelitian Pendahuluan

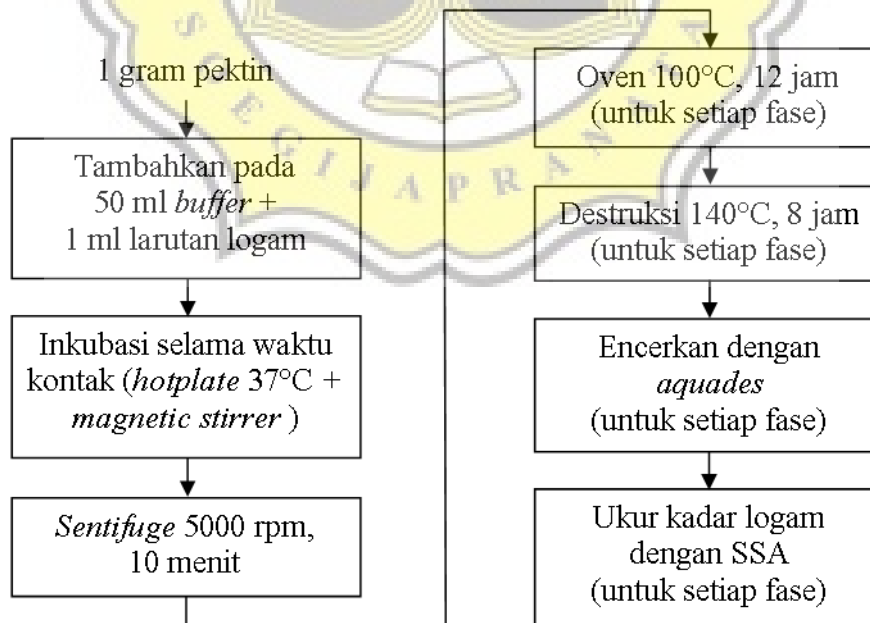
Pada penelitian pendahuluan ini, mula-mula ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak pektin ampas buah jeruk. Ekstrak pektin yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang sudah diisi dengan 50 ml *buffer* dan 1 ml larutan logam. Setelah itu, larutan yang terbentuk dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer*. Ekstrak pektin dan larutan logam dibiarkan berkontak di dalam sistem *in vitro*. Selanjutnya, larutan hasil inkubasi dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, fraksi tidak larut (endapan) dan fraksi larut (supernatan) dipisahkan dan dikeringkan dengan menggunakan oven bersuhu 100°C selama 12 jam, untuk analisa penentuan kadar logam berat dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

Sebelum diuji dengan menggunakan SSA, masing-masing fraksi didestruksi dengan menggunakan *teflon destruction bomb*. Sebelum destruksi, mula-mula sebanyak 0,1 gram bahan kering ditimbang dan ditambah dengan 2 ml larutan destruksi (1 HCl 37% : 4 HNO₃ 65%). Destruksi dilakukan dalam oven bersuhu 140°C selama 8 jam. Selanjutnya, cairan hasil destruksi diencerkan dengan penambahan aquades hingga mencapai 10 ml. Hasil dari pengenceran ini kemudian dihomogenkan dan diuji kadar logamnya. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Hasil pengikatan logam berat oleh pektin yang paling optimum ditunjukkan oleh kadar logam terukur yang paling kecil pada fraksi larut dan kadar logam terukur yang paling besar pada fraksi tidak larut. Setelah dilakukan analisa data, ditemukan waktu kontak antara ekstrak pektin dan logam berat dalam sistem *in vitro* yang paling optimum. Tahapan proses penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Gambar 7.

Untuk meningkatkan optimasi penelitian, pada penelitian pendahuluan juga dilakukan kontak antara pektin dengan *buffer* dalam sistem *in vitro* dengan menggunakan *tea bag* sebagai pemisah antara kedua fase (dalam desain penelitian pendahuluan digambarkan dengan garis putus-putus). Mula-mula ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak pektin ampas buah jeruk. Ekstrak pektin yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam *tea bag*. *Tea bag* yang berisi pektin kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang sudah diisi dengan 50 ml *buffer* dan 1 ml larutan logam. Setelah itu, larutan yang

terbentuk dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer*. Ekstrak pektin dan larutan logam dibiarkan berkontak di dalam sistem *in vitro*. Selanjutnya, larutan hasil inkubasi dipisahkan dengan meniriskan *tea bag* dari larutan *buffer*. Setelah pemisahan, fraksi tidak larut (dalam *tea bag*) dan fraksi larut (*buffer*) digunakan untuk analisa penentuan kadar logam berat dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

Sebelum diuji dengan menggunakan SSA, masing-masing fraksi didestruksi dengan menggunakan metode *dry ashing*. Sebelum destruksi, mula-mula seluruh sampel dikeringkan dengan menggunakan oven bersuhu 100°C selama 12 jam. Selanjutnya sampel kering diabukan dengan menggunakan tanur bersuhu 550°C selama 3 jam. Sampel yang telah menjadi abu lalu ditambah dengan 10 ml HNO₃ 0,1 N dan kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil dari pengenceran ini kemudian dihomogenkan dan diuji kadar logamnya. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Hasil pengikatan logam berat oleh pektin yang paling optimum ditunjukkan oleh kadar logam terukur yang paling kecil pada fraksi larut dan kadar logam terukur yang paling besar pada fraksi tidak larut. Tahapan proses kontak dalam sistem *in vitro* dapat dilihat pada Gambar 8 berikut.



Gambar 8. Sistem *In Vitro*

2.8. Penentuan Metode untuk Penelitian Utama

Apabila hasil dari upaya optimasi penelitian pendahuluan menunjukkan hasil yang tidak sesuai dengan harapan, maka metode yang digunakan untuk penelitian utama adalah metode kontak sistem *in vitro* langsung, tanpa menggunakan *tea bag* sebagai pemisah antara kedua fase. Dari penelitian pendahuluan, waktu kontak yang paling optimal untuk menyerap logam berat pada sistem *in vitro* akan digunakan sebagai waktu kontak pada penelitian utama.

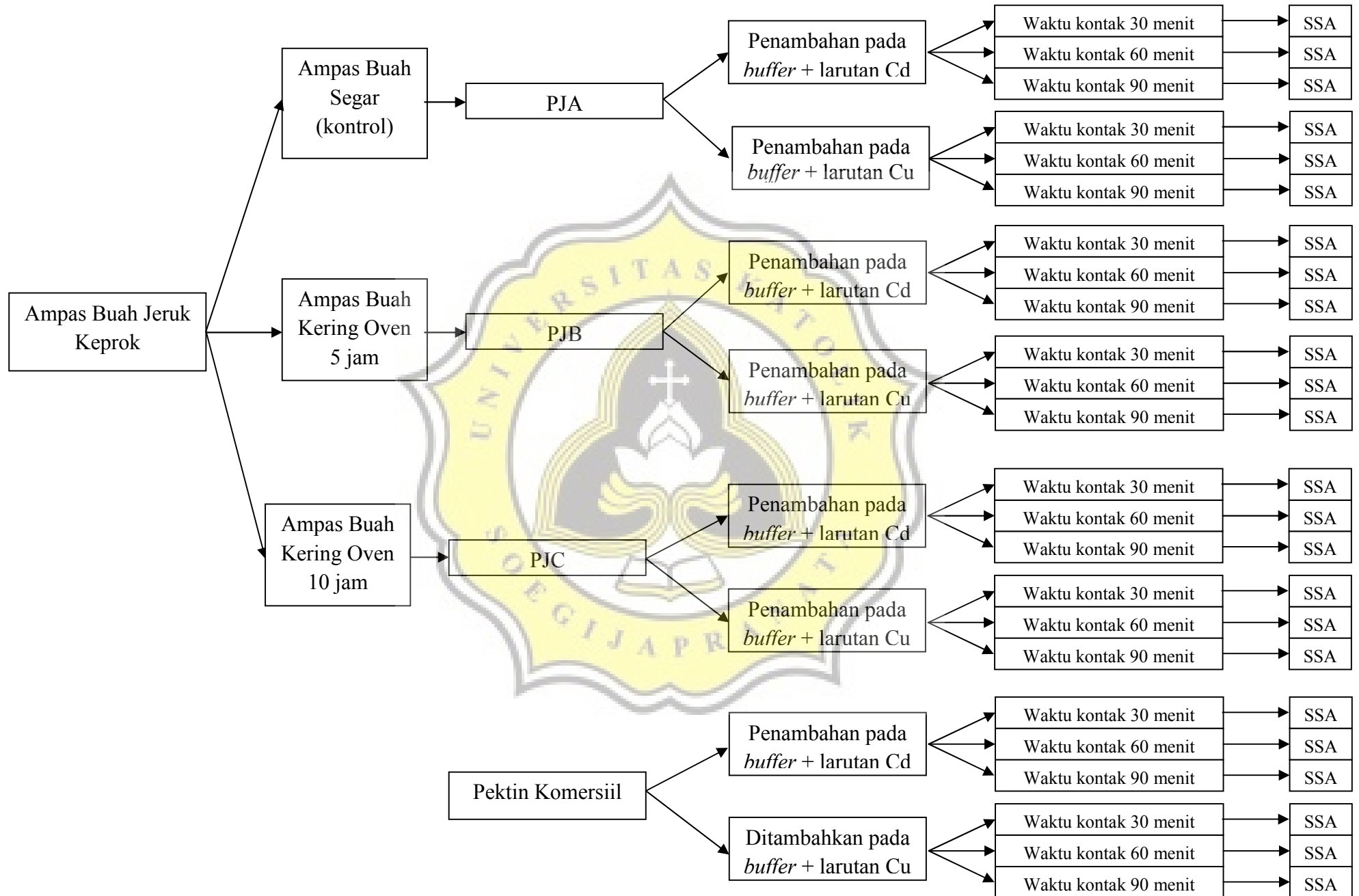
2.9. Penelitian Utama

Pada penelitian utama ini, mula-mula ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak pektin ampas buah jeruk yang telah diberi perlakuan pendahuluan. Ekstrak pektin yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml yang sudah diisi dengan 50 ml *buffer* dan 1 ml larutan logam. Setelah itu, larutan yang terbentuk dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer*. Ekstrak pektin dan larutan logam dibiarkan berkontak di dalam sistem *in vitro*. Selanjutnya, larutan hasil inkubasi dipisahkan dengan menggunakan sentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, fraksi tidak larut (endapan) dan fraksi larut (supernatan) dipisahkan dan dikeringkan dengan menggunakan oven bersuhu 100°C selama 12 jam, untuk analisa penentuan kadar logam berat dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

Sebelum diuji dengan menggunakan SSA, masing-masing fraksi didestruksi dengan menggunakan *teflon destruction bomb*. Sebelum destruksi, mula-mula sebanyak 0,1 gram bahan kering ditimbang dan ditambah dengan 2 ml larutan destruksi (1 HCl 37% : 4 HNO₃ 65%). Destruksi dilakukan dalam oven bersuhu 140°C selama 8 jam. Selanjutnya, cairan hasil destruksi diencerkan dengan penambahan aquades hingga mencapai 10 ml. Hasil dari pengenceran ini kemudian dihomogenkan dan diuji kadar logamnya. Penelitian utama dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Hasil pengikatan logam berat oleh pektin yang paling optimum ditunjukkan oleh kadar logam terukur yang paling kecil pada fraksi larut dan kadar logam terukur yang paling besar pada fraksi tidak larut. Setelah dilakukan analisa data, ditemukan waktu kontak antara ekstrak

pektin dan logam berat dalam sistem *in vitro* yang paling optimum. Proses tahapan penelitian utama disajikan pada Gambar 9.





Gambar 9. Desain Penelitian Utama

2.10. Penentuan Kadar Logam Berat

2.10.1. Penentuan Kadar Logam Kadmium (Cd)

Mula-mula, terlebih dahulu dilakukan pengaturan SSA sesuai logam yang akan diukur. Untuk logam Cd, digunakan lampu kadmium dengan *lamp current* 3 mA. Selanjutnya, SSA diatur dengan panjang gelombang 228,8 nm, slit 0,7 dan tingkat energi 55. Setelah itu, dilakukan kalibrasi dengan menggunakan tiga larutan Cd dengan konsentrasi yang berbeda. Setelah tahap kalibrasi berhasil dilakukan, SSA digunakan untuk mengukur kadar logam kadmium pada sampel. Hasil pengukuran dengan SSA dicatat sebagai konsentrasi (satuan ppm). Total massa logam yang ditemukan dalam bahan dapat diperoleh dengan perhitungan dengan rumus berikut:

$$Cd (\mu g) = C \times fp \times \frac{\text{massa sampel kering}}{\text{massa sampel destruksi}}$$

Keterangan:

C = kadar yang didapat dari hasil pengukuran ($\mu\text{g/ml}$)
 fp = faktor pengenceran

2.10.2. Penentuan Kadar Logam Tembaga (Cu)

Pertama-tama, terlebih dahulu dilakukan pengaturan SSA sesuai logam yang akan diukur. Untuk logam Cu, digunakan lampu tembaga dengan *lamp current* 15 mA. Selanjutnya, SSA diatur dengan panjang gelombang 324,8 nm, slit 0,7 dan tingkat energi 72. Setelah itu, dilakukan kalibrasi dengan menggunakan tiga larutan Cu dengan konsentrasi yang berbeda. Setelah tahap kalibrasi berhasil dilakukan, SSA digunakan untuk mengukur kadar logam tembaga pada sampel. Hasil pengukuran dengan SSA dicatat sebagai konsentrasi (satuan ppm). Total massa logam yang ditemukan dalam bahan dapat diperoleh dengan perhitungan dengan rumus berikut:

$$Cu (\mu g) = C \times fp \times \frac{\text{massa sampel kering}}{\text{massa sampel destruksi}}$$

Keterangan:

C = kadar yang didapat dari hasil pengukuran ($\mu\text{g/ml}$)
 fp = faktor pengenceran

2.10.3. Penentuan Kadar Logam Timbal (Pb)

Mula-mula, terlebih dahulu dilakukan pengaturan SSA sesuai logam yang akan diukur. Untuk logam Pb, digunakan lampu kadmium dengan *lamp current* 10 mA. Selanjutnya, SSA diatur dengan panjang gelombang 217,0 nm, slit 0,7 dan tingkat energi 48. Setelah

itu, dilakukan kalibrasi dengan menggunakan tiga larutan Pb dengan konsentrasi yang berbeda. Setelah tahap kalibrasi berhasil dilakukan, SSA digunakan untuk mengukur kadar logam timbal pada sampel. Hasil pengukuran dengan SSA dicatat sebagai konsentrasi (satuan ppm). Total massa logam yang ditemukan dalam bahan dapat diperoleh dengan perhitungan dengan rumus berikut:

$$Pb (\mu g) = C \times fp \times \frac{\text{massa sampel kering}}{\text{massa sampel destruksi}}$$

Keterangan:

C = kadar yang didapat dari hasil pengukuran ($\mu\text{g/ml}$)

fp = faktor pengenceran

2.11. Penentuan *Recovery*

Recovery menunjukkan perbandingan antara massa logam yang terbaca pada SSA dengan massa logam yang ditambahkan ke dalam sistem *in vitro*. Perhitungan *recovery* ini dapat juga digunakan untuk melihat distribusi logam terserap pada fase terlarut dan tidak terlarut dalam sistem *in vitro*. Untuk menghitung besarnya *recovery*, digunakan perhitungan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Persentase recovery (\%)} = \frac{\text{massa logam yang terbaca SSA}}{\text{massa logam ditambahkan pada sistem}} \times 100\%$$

2.12. Analisa Data

Hasil pengukuran massa logam yang terserap disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan grafik menggunakan *software Microsoft Office Excel 2007*. Uji statistik parametrik *One Way Anova* (dengan 12 kombinasi perlakuan, diperoleh dari 3 tingkat waktu kontak dan 4 jenis pektin) digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh waktu kontak dan perlakuan pendahuluan terhadap tingkat penyerapan logam oleh pektin. Perlakuan terbaik ditentukan dengan uji *Post Hoc* Wilayah Ganda Duncan. Selanjutnya, hubungan korelasi antar variabel diuji dengan menggunakan Uji Pearson. Seluruh komputasi dilakukan dengan *software IBM SPSS Statistics for Windows* versi 23.