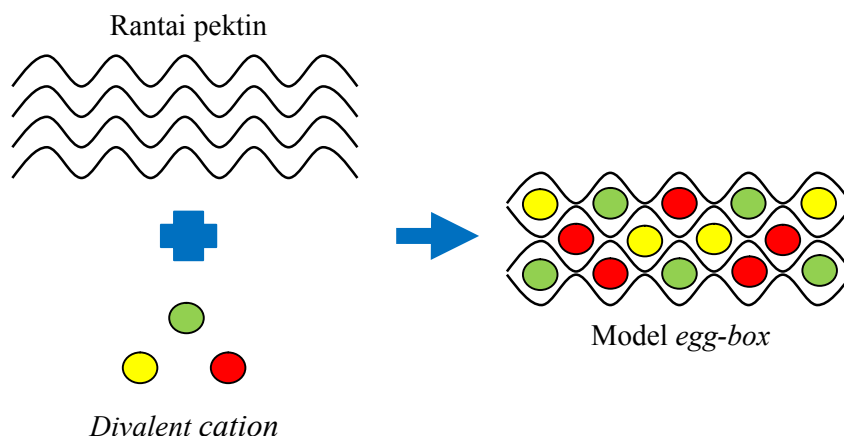


4. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi pektin yang diperoleh dari ampas jeruk keprok sebagai bahan baku. Bahan dasar pembuatan pektin yang sekarang digunakan dalam pembuatan pektin komersial adalah ampas apel serta kulit buah keluarga *Citrus* (termasuk jeruk, jeruk nipis dan lemon). Kedua bahan ini merupakan *by-products* yang diperoleh dari industri sari buah. Selain itu, serat buah bit juga digunakan sebagai bahan baku pektin komersial dalam jumlah yang kecil. Bahan ini diperoleh dari sisa pemisahan serat yang dihasilkan oleh industri gula pasir (Brejnholt, 2010).

Ampas jeruk merupakan bagian dari buah jeruk yang dikategorikan sebagai *waste*, namun sebenarnya kaya akan kandungan pektin (Hariyati, 2006). Untuk memastikan sampel jeruk yang digunakan dipilih dengan teknik *sampling* yang seragam, buah jeruk keprok yang digunakan berasal dari peti buah yang sama. Buah jeruk keprok ini dipilih yang memiliki tingkat kematangan rendah. Hal itu dikarenakan pektin berada pada buah yang belum sepenuhnya matang. Hal ini terjadi karena seiring dengan matangnya buah, lamella akan mengalami perubahan struktur menjadi lebih lunak karena adanya gangguan pada pektin yang menyusun struktur tersebut (Buren, 1991).

Jenis pektin yang ingin diperoleh pada proses ekstraksi ini ialah *low methoxyl pectin* (LMP), karena pektin jenis ini memiliki kemampuan mengikat yang lebih baik, apabila dibandingkan dengan *high methoxyl pectin* (HMP). HMP dapat membentuk gel pada kondisi asam dan dalam sistem yang mengandung gula. Berbeda dengan HMP, LMP dapat membentuk gel pada rentang pH yang lebih luas dan tanpa keberadaan gula, namun membutuhkan adanya kation bebas pada sistem. LMP dapat larut pada sistem yang mengandung garam natrium atau kalium. LMP yang bermuatan negatif dapat berikatan dengan kation bermuatan positif sehingga terbentuk *cross-link*. Natrium, kalium serta ion monovalen yang lain dapat terikat pada rantai pektin secara elektrostatik, sedangkan *divalent cation* diikat oleh LMP dengan mekanisme *egg-box* (Brejnholt, 2010). Ilustrasi pengikatan logam oleh pektin dapat dilihat pada Gambar 12 berikut ini.



Gambar 12. Mekanisme Pengikatan Logam oleh Pektin

Pektin diekstrak dari ampas buah jeruk keprok dengan menggunakan metode ekstraksi asam yang dipadukan dengan penggunaan suhu tinggi (Buren, 1991). Untuk memperoleh LMP diperlukan metode ekstraksi yang melibatkan enzim atau kombinasi asam-suhu tinggi (Walter, 1991). Selain dapat mengikat dengan lebih baik, LMP cenderung lebih stabil terhadap uap air dan panas (Pilgrim *et al.*, 1991). Untuk memproduksi pektin dengan rendemen yang tinggi, dilakukan ekstraksi pektin dengan kombinasi antara pH rendah dengan temperatur tinggi, yang dilanjutkan dengan pengendapan dalam pelarut organik (Brejnholt, 2010).

Pengendapan pektin yang telah diekstrak dari pengotor yang tidak diinginkan akan lebih efisien apabila menggunakan pelarut dalam jumlah besar (lebih banyak daripada bahan yang diekstrak). Pelarut organik yang diizinkan oleh standar pangan internasional adalah metanol, etanol atau isopropanol. Setelah pektin diendapkan dan dipisahkan dengan penambahan larutan organik, pektin akan dicuci dengan cairan yang mengandung asam. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan kontaminan, seperti: asam, gula, dan polifenol (Brejnholt, 2010).

Ekstraksi pektin yang dilakukan dengan suhu yang semakin tinggi dalam waktu yang semakin lama akan menghasilkan rendemen pektin yang lebih tinggi. Dari hal ini diketahui bahwa suhu ekstraksi dan waktu ekstraksi berbanding lurus dengan rendemen

pektin yang dihasilkan (Hariyati, 2006). Penggunaan asam digunakan pada ekstraksi pektin untuk mempercepat pemisahan pektin dari matriks dinding sel. Sedangkan pemanasan digunakan untuk meningkatkan rendemen pektin yang diperoleh. Kombinasi yang umum dilakukan pada ekstraksi pektin ialah suhu 50-90°C pada pH 1-3. Untuk memperoleh LMP, pH rendah dan suhu sekitar 50-90°C digunakan untuk menghidrolisis ikatan ester pada pektin (Brejnholt, 2010).

Pada penelitian ini juga diberikan perlakuan pendahuluan yang berbeda, untuk mengetahui jenis perlakuan pendahuluan yang dapat menghasilkan pektin dengan rendemen yang paling tinggi. Perlakuan pendahuluan yang diberikan pada bahan baku ialah ampas jeruk yang diekstrak tanpa perlakuan pendahuluan (PJA), ampas jeruk yang diberi perlakuan pendahuluan berupa pengeringan dengan menggunakan oven bersuhu 55°C selama 5 jam (PJB), dan ampas jeruk yang diberi perlakuan pendahuluan berupa pengeringan dengan menggunakan oven bersuhu 55°C selama 10 jam (PJC). Pada perlakuan pendahuluan ini, tidak diberikan *pre-treatment* terhadap panas. Hal ini disebabkan karena LMP merupakan jenis pektin yang cukup stabil pada suhu yang tidak terlalu tinggi, seperti suhu yang digunakan dalam pengeringan, yaitu 55°C (Pilgrim *et al.*, 1991).

Dengan pemberian perlakuan pendahuluan ini, diharapkan akan diketahui kadar air ampas jeruk yang optimum untuk memperoleh rendemen pektin yang lebih tinggi. Dari penelitian yang dilakukan, rendemen pektin yang paling tinggi didapatkan dari PJC. Hal tersebut menunjukkan semakin tinggi kadar air pada bahan baku, rendemen pektin yang diperoleh akan semakin rendah, karena kadar air bahan baku berbanding terbalik dengan rendemen pektin. Hal ini disebabkan karena keberadaan air pada bahan baku akan menghalangi terjadinya kontak antara pektin yang ingin diekstrak dengan *solvent* pengekstrak (Fitriani, 2003). Selain itu kadar air bahan baku yang rendah akan lebih memudahkan proses ekstraksi. Kadar air bahan baku yang tinggi akan menambah massa serta volume bahan saat proses ekstraksi, yang mengurangi nilai ekonomis pada produk.

Bahan baku pembuatan pektin juga diberi perlakuan pendahuluan untuk meningkatkan laju adsorpsi. Faktor yang turut mempengaruhi laju adsorpsi ialah waktu kontak, pH,

konsentrasi, dosis dan kuatnya ikatan ionik yang menarik logam dari sistem. Dalam proses adsorpsi, terdapat empat tahapan yang terjadi, yakni: (1) transfer fase terlarut dari sistem ke lapisan pembatas (*boundary film*) yang berada di sekeliling permukaan adsorben, (2) perpindahan fase terlarut dari lapisan pembatas ke permukaan adsorben, (3) perpindahan fase terlarut dari permukaan adsorben ke titik aktif intrapartikuler, dan (4) interaksi antara molekul terlarut dan titik adsorpsi yang tersedia pada permukaan bagian dalam adsorben (Kursunge *et al.*, 2014).

4.1. Sistem *In Vitro*

Pektin merupakan salah satu substrat yang dapat digunakan sebagai senyawa pengkelat. Senyawa pengkelat memiliki fungsi pengikat, sehingga dapat dimanfaatkan untuk mengikat logam berat (Saputri *et al.*, 2014). Pektin ampas jeruk yang dihasilkan dari penelitian ini diharapkan dapat mengikat logam berat yang bersifat toksik di dalam tubuh. Logam berat yang telah diikat oleh pektin dapat dikeluarkan dari dalam tubuh (Srivastava & Malviya, 2011).

Sebelum digunakan secara langsung dalam sistem pencernaan manusia, pektin yang diekstrak dari ampas jeruk keprok ini terlebih dahulu diujikan dalam sistem *in vitro*. Dalam sistem *in vitro* ini digunakan *buffer* yang sesuai dengan cairan dalam sistem pencernaan manusia. Penggunaan pektin dalam sistem *in vitro* dinilai sangat sesuai, karena sifat yang diinginkan dapat dijaga dalam sistem yang mengandung *buffer*. Penambahan *buffer* ini biasa digunakan oleh industri untuk mengontrol pH atau mengatur pektin dalam karakteristik tertentu yang diharapkan selama masa penyimpanan. Pektin bersifat stabil pada pH 3.5-4.0 dan akan terdegradasi di luar pH tersebut. Pektin juga rentan terhadap temperatur tinggi. Pektin memiliki sifat larut dalam air, namun tidak dapat larut pada alkohol dan sebagian besar pelarut organik. Apabila terpapar pada kondisi pH dan temperatur yang tidak sesuai, pektin akan mengalami de-esterifikasi dan de-polimerisasi (Brejnholt, 2010).

Ke dalam *buffer* ini juga ditambahkan larutan logam berat dengan konsentrasi yang melebihi batasan yang diperbolehkan di dalam makanan. Sistem ini mewakili sistem pencernaan manusia yang mengandung akumulasi logam berat. Selanjutnya, untuk

mengetahui apakah pektin yang diekstrak dari ampas jeruk keprok dapat digunakan untuk menyerap logam, ditambahkan pula ekstrak pektin ampas jeruk keprok ke dalam sistem *in vitro*. Sistem ini kemudian dibiarkan berkontak dengan beberapa waktu kontak yang berbeda untuk mengetahui waktu kontak yang paling optimum untuk menyerap logam berat ke dalam pektin. Selanjutnya sistem *in vitro* yang membentuk gel dipisahkan dengan sentrifugasi. Hasil sentrifugasi ini akan menampilkan dua fase yang berbeda, berupa: fase terlarut dan fase tidak terlarut. Fase terlarut terdiri atas *buffer* yang terdapat pada sistem pencernaan, sedangkan fase tidak terlarut merupakan kompleks pektin yang mengikat logam berat.

4.2. Hasil Penyerapan Logam pada Penelitian Pendahuluan

Dari penelitian pendahuluan yang dilakukan oleh penulis, diperoleh hasil bahwa *recovery* yang diujikan pada tiga logam berat (Cd, Cu, dan Pb) menunjukkan hasil yang berbeda. *Recovery* ini yang menunjukkan jumlah logam berat yang terbaca dalam sistem *in vitro*. Logam berat yang mampu diikat karena pektin memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan dengan logam yang bersifat kation polivalen, contohnya kalsium (Ca) dan tembaga (Cu). Dengan ada penelitian ini, diketahui bahwa pektin ampas jeruk yang tidak diberi perlakuan pendahuluan menunjukkan penyerapan logam yang paling optimum pada waktu kontak sistem selama satu jam. Waktu kontak ini dipilih sebagai waktu kontak yang paling optimum setelah dilakukan analisa dengan menggunakan uji beda nyata Duncan.

Pektin merupakan suspensi koloid yang *reversible*, dimana rantai pektin dapat membentuk ikatan silang gugus ester karena adanya kelompok logam yang menyokong pembentukan gel polisakarida (Buren, 1991). Hasil penyerapan logam yang tidak berpola pada berbagai waktu kontak dapat terjadi akibat sifat *reversible* yang dimiliki pektin. Saat pektin mengikat logam dan membentuk gel pada suatu waktu kontak, maka kadar logam yang terukur pada fase tidak terlarut menunjukkan angka yang tinggi. Namun seiring dengan berjalannya waktu kontak, gel pektin mengalami penurunan viskositas (menjadi encer) karena rantai pektin melepaskan logam. Hal itu akan menyebabkan nilai pengukuran kadar logam yang rendah pada fase tidak larut yang berkontak selama waktu kontak tertentu pada sistem *in vitro*.

Untuk meningkatkan optimasi penelitian pendahuluan, dilakukan pula uji penyerapan dengan memanfaatkan *tea bag* sebagai separator antar fase, menggantikan fungsi sentrifugasi. Namun setelah dibandingkan dengan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya, hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan perkiraan. *Recovery* yang diperoleh jauh lebih rendah pada hasil optimasi penelitian pendahuluan. Selain itu, dari penelitian pendahuluan juga diketahui bahwa hasil pengukuran timbal yang diperoleh tidak *valid* apabila dibandingkan dengan kedua logam yang lain (Cd dan Cu). *Recovery* yang diperoleh jauh melampaui 100% dapat disebabkan oleh adanya masalah pada piranti deteksi logam Pb. Oleh karena itu, pengujian pada logam timbal ditiadakan pada penelitian utama.

4.3. Hasil Penyerapan Logam pada Penelitian Utama

Pada penelitian utama, kembali dilakukan uji penyerapan logam dengan pektin yang diekstrak dari ampas jeruk keprok, namun waktu kontak dan jenis pektin yang digunakan berbeda apabila dibandingkan dengan penelitian pendahuluan. Pada penelitian utama, waktu kontak yang digunakan ialah waktu kontak yang optimum saat penelitian pendahuluan, ditambah dengan ± 30 menit. Hal ini digunakan untuk memperkecil rentang waktu kontak yang paling optimum untuk menyerap logam berat pada sistem *in vitro*.

Pada penelitian utama, semakin tinggi jumlah logam yang terserap dalam fase tidak terlarut, akan menunjukkan bahwa pektin memiliki kemampuan penyerap logam berat dengan baik. Hal tersebut disebabkan karena fase tidak larut terdiri atas pektin yang memiliki gugus karboksil bebas yang dapat mengikat logam. Pektin ampas jeruk merupakan LMP yang dapat membentuk gel pada sistem yang mengandung ion divalen. Ion divalen seperti logam berat akan berikatan dengan gugus karboksil (COO^-) dan membentuk mekanisme *egg-box*. Selama proses pembentukan gel, terdapat pula interaksi intermolekuler yang berikatan dengan lemah, misalnya: ikatan hidrogen (Urias-Orona *et al.*, 2010).

Pada logam kadmium, jumlah logam terserap dalam fase tidak terlarut yang paling tinggi diperoleh kombinasi pektin komersil dengan waktu kontak sistem *in vitro* selama 30 menit, diikuti oleh PJC – 30 menit, PJC – 60 menit, PJA – 90 menit, PJC – 90 menit, dan PJA – 30 menit yang berkisar antara $119,333 \pm 4,374 \mu\text{g}$ dan $124,517 \pm 3,853 \mu\text{g}$. Pada logam tembaga, jumlah logam terserap dalam fase tidak terlarut yang paling tinggi diperoleh kombinasi PJC dengan waktu kontak sistem *in vitro* selama 30 menit.

Beda nyata yang diperoleh pada rata-rata logam didasarkan pada waktu kontak atau perlakuan pendahuluan di atas ditentukan dengan uji beda nyata Duncan. Melalui penelitian ini, dapat diketahui efektivitas pektin yang diekstrak dari limbah ampas jeruk keprok untuk mengurangi akumulasi logam berat secara *in vitro*. Ekstrak pektin tersebut dapat mengikat logam dengan kekuatan ikatan yang berbeda-beda pada setiap logam. Perbedaan ini disebabkan karena perbedaan afinitas pektin terhadap logam. Pada penelitian ini, massa logam yang terserap pada fase tidak terlarut pada logam kadmium menunjukkan rata-rata yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan logam tembaga. Hal tersebut disebabkan karena afinitas pektin terhadap kadmium lebih besar, dibandingkan dengan afinitas pektin terhadap tembaga. Dibandingkan dengan kedua logam ini, afinitas pektin terhadap timbal cenderung lebih besar. Hal itu menyebabkan pengukuran yang dilakukan cenderung melampaui batas atas standar (larutan *stock S₃*), sehingga hasil yang diperoleh tidak dapat digambarkan ke dalam kurva standar (Endress, 1991).

Recovery yang lebih dari 100% pada penelitian ini menunjukkan adanya *error* pada analisa kimia yang diperoleh dari alat yang digunakan serta piranti pendeteksi, maupun bahan yang mengandung logam. Di samping itu, melalui penelitian ini, ditemukan bahwa perlakuan pengeringan dengan menggunakan oven tidak memberikan pengaruh pada waktu kontak sistem *in vitro*. Meskipun begitu, kombinasi antara perlakuan pengeringan dan waktu kontak memberikan pengaruh pada banyaknya logam yang diikat oleh fase tidak terlarut. Hal itu ditunjukkan oleh adanya korelasi antara waktu kontak dan banyaknya logam kadmium yang diserap oleh fase tidak terlarut, serta antara perlakuan pengeringan dan banyaknya logam tembaga yang terserap pada fase tidak terlarut (analisa korelasi dengan menggunakan uji Pearson dapat dilihat pada lampiran).

Pektin yang diekstrak dari bahan baku ampas jeruk keprok ini efektif dalam menyerap logam berat dalam sistem *in vitro*. Dibandingkan dengan semua kombinasi perlakuan pendahuluan dan waktu kontak, PJC yang berkontak selama 30 menit menunjukkan hasil yang signifikan pada tingkat kepercayaan 95%. Penelitian *in vivo* sangat dianjurkan untuk mengetahui apakah pektin ampas jeruk keprok dapat dimanfaatkan sebagai *supplement* untuk menurunkan kadar logam berat dari dalam tubuh. Selain itu, dengan pemanfaatan ampas jeruk keprok sebagai *supplement* pengikat logam, diharapkan dapat menjadi solusi penanganan limbah bagi industri sari buah jeruk.

