

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan termasuk dalam *experimental* karena peneliti akan memberi perlakuan pada subjek penelitian dan efek dari perlakuan tersebut akan diukur (Zainuddin, 2014). Berikut ini merupakan rancangan penelitian yang digunakan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel cangkang lorjuk dengan bahan yang diperoleh dari Pulau Madura, Jawa Timur.
2. Karakterisasi serbuk cangkang lorjuk
3. Validasi metode penentuan kadar logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} .
4. Pengamatan kemampuan daya serap logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} oleh serbuk cangkang lorjuk.
 - a. Penentuan efisiensi adsorpsi logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} .
 - b. Penentuan kapasitas adsorpsi logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} .
5. Analisis data

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan adalah lorjuk yang berasal dari P.Madura, Jawa Timur. Sampel penelitian yang digunakan adalah cangkang lorjuk yang diperoleh dari Pulau Madura dan telah diidentifikasi oleh Dr. Moch. Affandi, M.Si Unit Layanan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga Surabaya sebagai *Solen vagina*.

4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel

4.3.1 Klasifikasi Variabel

- a. Variabel bebas pada penelitian ini adalah jenis ion logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} .
- b. Variabel kontrol pada penelitian ini adalah volume larutan logam, konsentrasi awal logam, massa biosorben, dan waktu kontak.
- c. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah persentase efisiensi dan kapasitas adsorpsi.

4.3.2 Definisi Operasional

- a. Serbuk cangkang lorjuk spesies *Solen vagina* diperoleh dari Bangkalan, Madura, Jawa Timur dan diubah menjadi bentuk serbuk.
- b. Waktu kontak merupakan waktu yang dibutuhkan serbuk cangkang lorjuk untuk bereaksi dalam menyerap logam. Pengamatan dilakukan pada waktu kontak 20, 40, 60, 90, dan 120 menit.
- c. Massa biosorben merupakan massa serbuk cangkang lorjuk yang dimasukkan dalam kolom. Pengamatan dilakukan pada massa 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; dan 2,0 gram.
- d. Konsentrasi logam berat yang digunakan dalam penelitian adalah 20, 40, 60, 80, dan 100 mg/L.
- e. Larutan kontrol merupakan larutan HNO_3 1% yang dilewatkan dalam kolom berisi serbuk cangkang lorjuk (*Solen vagina*).
- f. HNO_3 1% digunakan sebagai pelarut yang berasal dari pengenceran HNO_3 65% dengan aquademineralisasi.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah serbuk cangkang lorjuk (*Solen vagina*) (Pulau Madura, Jawa Timur), larutan standar logam berat: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ p.a (*Merck*), $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ p.a (*Merck*) 1000 mg/L, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ p.a (*Merck*) 1000 mg/L, HNO_3 p.a 65% (*Merck*), aquademineralisasi.

4.4.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah neraca analitik (OhausTM), kolom gelas dengan diameter 1,7 cm dan panjang 15 cm, seperangkat alat *reflux*, mantel pemanas, alat-alat gelas dan *stopwatch*. Instrumentasi yang digunakan adalah Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) nyala api (*Shimadzu AA-7000*) dan pH meter (*Beckman*).

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Rentang waktu yang dilalui bulan Juli sampai Januari 2020.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan dipersiapkan terlebih dahulu sesuai dengan yang telah ditentukan pada sub bab 4.4. Berikut ini merupakan persiapan pembuatan larutan HNO_3 1% dan larutan standar logam berat, yaitu: Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} sesuai dengan variasi konsentrasi yang telah ditentukan.

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, maka dibutuhkan masing-masing

10,0; 20,0; 30,0; 40,0; dan 50,0 ml Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} 1000 mg/L. Kemudian diencerkan menggunakan HNO_3 1% (dalam aquadem) hingga batas labu ukur 500 ml untuk membuat larutan 20, 40, 60, 80, dan 100 mg/L secara berurutan.

Persiapan serbuk cangkang lorjuk dilakukan dengan mencuci lorjuk yang telah didapatkan dari Pulau Madura, Jawa Timur menggunakan air bersih. Kemudian direbus hingga mendidih dan setelah dingin dipisahkan antara daging dan cangkang. Cangkang tersebut dijemur selama ± 24 jam hingga kering. Selanjutnya cangkang ditumbuk dengan mortar terlebih dahulu agar memudahkan dalam proses penghalusan menggunakan blender. Serbuk kasar yang sudah dihaluskan menggunakan blender, diayak dengan ayakan 100 mesh untuk menghasilkan serbuk cangkang yang memiliki ukuran sama atau homogen (Mokoena, *et al.*, 2019).

4.6.2 Karakterisasi Biosorben

Karakterisasi serbuk cangkang lorjuk dilakukan dengan menggunakan *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Attenuated Total Reflection* (FTIR-ATR, *Bruker Alpha II*) yang dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga untuk menentukan distribusi gugus fungsi yang terlibat sebelum dan setelah biosorpsi Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} menggunakan serbuk cangkang lorjuk dalam kisaran bilangan gelombang $4000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$. Analisis *X-Ray Fluorescence* (XRF) juga dilakukan di Laboratorium Energi dan Lingkungan (LPPM ITS) untuk mendeteksi kandungan mineral serbuk cangkang. Percobaan dilakukan pada kondisi: tabung sinar X bertegangan 30 kV, suhu 22.1°C , dan kelembaban 55%.

4.7 Validasi Metode

4.7.1 Linearitas Timbal (Pb)

Larutan baku kerja disiapkan dengan cara mengencerkan larutan standar Pb^{2+} 1000 ppm menjadi 1,0 ppm dalam labu ukur 100,0 ml dengan penambahan pelarut HNO_3 1% hingga tanda batas. Berikut merupakan proses pengenceran yang dilakukan:

a. Larutan baku kerja 0,05 ppm

Dipipet 0,5 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

b. Larutan baku kerja 0,1 ppm

Dipipet 1,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

c. Larutan baku kerja 0,2 ppm

Dipipet 2,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

d. Larutan baku kerja 0,3 ppm

Dipipet 3,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

e. Larutan baku kerja 0,4 ppm

Dipipet 4,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

f. Larutan baku kerja 0,5 ppm

Dipipet 5,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

g. Larutan baku kerja 0,6 ppm

Dipipet 6,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

h. Larutan baku kerja 0,7 ppm

Dipipet 7,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

i. Larutan baku kerja 0,8 ppm

Dipipet 8,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

j. Larutan baku kerja 0,9 ppm

Dipipet 9,0 ml larutan standar Pb^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

Seluruh larutan baku kerja dianalisis menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA). Absorbansi yang telah diperoleh diolah data menggunakan persamaan regresi linear $y=bx+a$. Hasil memiliki hubungan linier bila memiliki harga r kurang lebih 0,999 (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

4.7.2 Linearitas Kadmium (Cd)

Larutan baku kerja disiapkan dengan cara mengencerkan larutan standar Cd^{2+} 1000 ppm menjadi 1,0 ppm dalam labu ukur 50,0 ml dengan penambahan pelarut HNO_3 1% hingga tanda batas. Berikut merupakan proses pengenceran yang dilakukan:

a. Larutan baku kerja 0,1 ppm

Dipipet 1,0 ml larutan standar Cd^{2+} 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu

ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO₃ 1% hingga tanda batas.

b. Larutan baku kerja 0,2 ppm

Dipipet 2,0 ml larutan standar Cd²⁺ 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO₃ 1% hingga tanda batas.

c. Larutan baku kerja 0,4 ppm

Dipipet 4,0 ml larutan standar Cd²⁺ 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO₃ 1% hingga tanda batas.

d. Larutan baku kerja 0,6 ppm

Dipipet 6,0 ml larutan standar Cd²⁺ 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO₃ 1% hingga tanda batas.

e. Larutan baku kerja 0,8 ppm

Dipipet 8,0 ml larutan standar Cd²⁺ 1,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO₃ 1% hingga tanda batas.

Seluruh larutan baku kerja dianalisis menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA). Absorbansi yang telah diperoleh diolah data menggunakan persamaan regresi linear $y=bx+a$. Hasil memiliki hubungan linier bila memiliki harga r kurang lebih 0,999 (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

4.7.3 Linearitas Tembaga (Cu)

Larutan baku kerja disiapkan dengan cara mengencerkan larutan standar Cu²⁺ 1000 ppm menjadi 10,0 ppm dalam labu ukur 100,0 ml dengan penambahan pelarut HNO₃ 1% hingga tanda batas. Berikut merupakan proses pengenceran yang dilakukan:

a. Larutan baku kerja 0,1 ppm

Dipipet 0,1 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

b. Larutan baku kerja 0,5 ppm

Dipipet 0,5 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

c. Larutan baku kerja 1,0 ppm

Dipipet 1,0 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

d. Larutan baku kerja 1,5 ppm

Dipipet 1,5 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

e. Larutan baku kerja 2,0 ppm

Dipipet 2,0 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

f. Larutan baku kerja 2,5 ppm

Dipipet 2,5 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

g. Larutan baku kerja 3,0 ppm

Dipipet 3,0 ml larutan standar Cu^{2+} 10,0 ppm dan dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml, lalu ditambahkan HNO_3 1% hingga tanda batas.

Seluruh larutan baku kerja dianalisis menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA). Olah data absorbansi yang telah diperoleh menggunakan

persamaan regresi linear $y=bx+a$. Hasil yang memiliki hubungan linier bila memiliki harga kurang lebih 0,999 (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

4.7.4 *Limit of Detection (LOD)* dan *Limit of Quantification (LOQ)*

Pada penentuan LOD dan LOQ menggunakan instrumen, dapat dilakukan dengan mengukur respon blangko beberapa kali. Kemudian dapat dihitung menggunakan persamaan 2.5.

4.7.5 Akurasi dan Presisi

Pada penentuan kadar akurasi dan presisi dibutuhkan sampel simulasi dengan kadar 80%, 100%, dan 120% dengan replikasi tiga kali. Pelarut HNO_3 1% dilewatkan dalam kolom yang berisi serbuk cangkang lorjuk dan disebut sebagai larutan kontrol. Dimasukkan sejumlah analit logam dalam labu ukur 10,0 mL sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan dan dilarutkan dengan larutan kontrol hingga tanda batas. Selanjutnya analisis larutan dan data yang diperoleh dibandingkan dengan kadar sebenarnya. Pengamatan dilakukan sebanyak tiga kali. Hasil uji akurasi dapat dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan pada sampel dan hasil uji presisi dinyatakan sebagai RSD yang didapatkan melalui persamaan 2.3 dan 2.4 (Yuwono dan Indrayanto, 2005).

4.8 Penentuan Kadar Logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} dalam Biosorben

Masing-masing serbuk cangkang lorjuk 1 g dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Didestruksi menggunakan 10 ml HNO_3 5M tetes demi tetes pada labu alas bulat yang telah dihubungkan oleh reflux. Pemanasan dilakukan pada suhu 180°C selama kurang lebih 2 jam hingga larutan lebih jernih dibandingkan sebelumnya,

ditunggu hingga larutan dingin. Setelah proses destruksi memungkinkan terdapat endapan didasar labu alas bulat. Disaring menggunakan kertas saring WhatmanTM No. 41. Supernatan 1,0 mL diencerkan menggunakan HNO₃ 1% hingga tanda batas labu ukur 10,0 mL dan dianalisis menggunakan instrumen Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) (Mokoena, 2019)

4.9 Penentuan Kadar Logam Pb²⁺, Cd²⁺, dan Cu²⁺ dalam Larutan Kontrol

Larutan kontrol terdiri dari 10 mL HNO₃ 1% (v/v) yang dilewatkan dalam kolom berisi serbuk cangkang lorjuk dan didiamkan selawa waktu kontak yang telah ditentukan. Selanjutnya aliran kolom dibuka dan eluen ditampung dan dianalisis menggunakan SSA. Apabila terdapat logam yang terkandung dalam biosorben, maka besar kemungkinan logam tersebut akan terikat dalam larutan kontrol (HNO₃ 1%). Konsentrasi logam yang terikat tersebut dapat dicari dengan persamaan $y=a+bx$ menggunakan absorbansi yang telah diperoleh sehingga dapat digunakan sebagai faktor koreksi.

4.10 Proses Biosorpsi dan Penentuan Kadar Pb²⁺, Cd²⁺, dan Cu²⁺

4.10.1 Pengaruh Konsentrasi Awal Logam

Percobaan dilakukan pada kondisi suhu kamar dengan lima konsentrasi logam Pb²⁺, Cd²⁺, dan Cu²⁺ masing-masing 20; 40; 60; 80; dan 100 mg/L serta replikasi sebanyak tiga kali. Prosedur percobaan dilakukan dengan cara memasukkan biosorben dengan massa 1,5 gram. Kemudian dipipet larutan logam dengan konsentrasi yang telah ditentukan sebanyak 10 ml. Didiamkan selama 60 menit lalu aliran kolom di buka dan eluen ditampung. Hasil yang diperoleh memungkinkan adanya biosorben yang terikat dalam larutan, maka disaring

menggunakan kertas saring Whatman™ no.41. Selanjutnya eluen tersebut dianalisis menggunakan SSA. Persamaan $y=a+bx$ digunakan untuk mencari konsentrasi logam sisa dengan menggunakan absorbansi yang telah diperoleh.

4.10.2 Pengaruh Konsentrasi Massa Biosorben

Percobaan dilakukan pada kondisi suhu kamar dengan lima massa biosorben masing-masing 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; dan 2,0 g serta direplikasi tiga kali. Prosedur percobaan dilakukan dengan cara memasukkan biosorben dengan massa yang telah ditentukan. Kemudian dipipet larutan logam dengan konsentrasi 60 ppm sebanyak 10 ml. Didiamkan selama 60 menit lalu aliran kolom dibuka dan eluen ditampung. Disaring menggunakan kertas saring Whatman™ no. 41, selanjutnya eluen tersebut dianalisis menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA). Persamaan $y=a+bx$ digunakan untuk mencari konsentrasi logam sisa dengan menggunakan absorbansi yang telah diperoleh.

4.10.3 Pengaruh Waktu Kontak

Percobaan dilakukan pada kondisi suhu kamar dengan lima variasi waktu kontak, masing-masing 20; 40; 60; 90; dan 120 menit serta replikasi tiga kali. Prosedur percobaan dilakukan dengan cara memasukkan biosorben dengan massa 1,5 gram. Kemudian dipipet larutan logam dengan konsentrasi 60 ppm 10 ml. Didiamkan sesuai waktu kontak yang telah ditentukan lalu aliran kolom dibuka dan eluen ditampung. Eluen disaring menggunakan kertas saring Whatman™ no.41. Selanjutnya dianalisis eluen tersebut menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA). Data yang diperoleh diolah sehingga dapat menghasilkan %

efisiensi dan kapasitas adsorpsi. Persamaan $y=a+bx$ digunakan untuk mencari konsentrasi logam sisa dengan menggunakan absorbansi yang telah diperoleh.

Tabel 4.1. Rancangan penelitian masing-masing parameter

Rancangan Penelitian					
[Logam] (mg/L)	20	40	60	80	100
Massa biosorben (gram)	1,0	1,25	1,5	1,75	2,0
Waktu (menit)	20	40	60	90	120

4.11 Analisis Data

4.11.1 Perhitungan Persentase Efisiensi

Penentuan persentase efisiensi adsorpsi dapat dilakukan berdasarkan konsentrasi awal logam dan konsentrasi setelah kontak dengan sampel biosorben melalui perhitungan dengan menggunakan persamaan 4.1 yaitu:

$$Efisiensi\ adsorpsi = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100\% \dots\dots\dots (4.1)$$

Keterangan:

C_0 = Konsentrasi awal logam (mg/L)

C_e = Konsentrasi akhir logam (mg/L)

4.11.2 Perhitungan Kapasitas Adsorpsi

Penentuan kapasitas adsorpsi yaitu jumlah ion logam yang terserap dapat ditentukan melalui perhitungan menggunakan rumus 4.2.

$$q_e = \frac{C_0 - C_e}{m} \times v \dots\dots\dots (4.2)$$

Keterangan:

q_e = Jumlah ion logam yang terserap (mg/g)

V = Volume larutan ion logam (L)

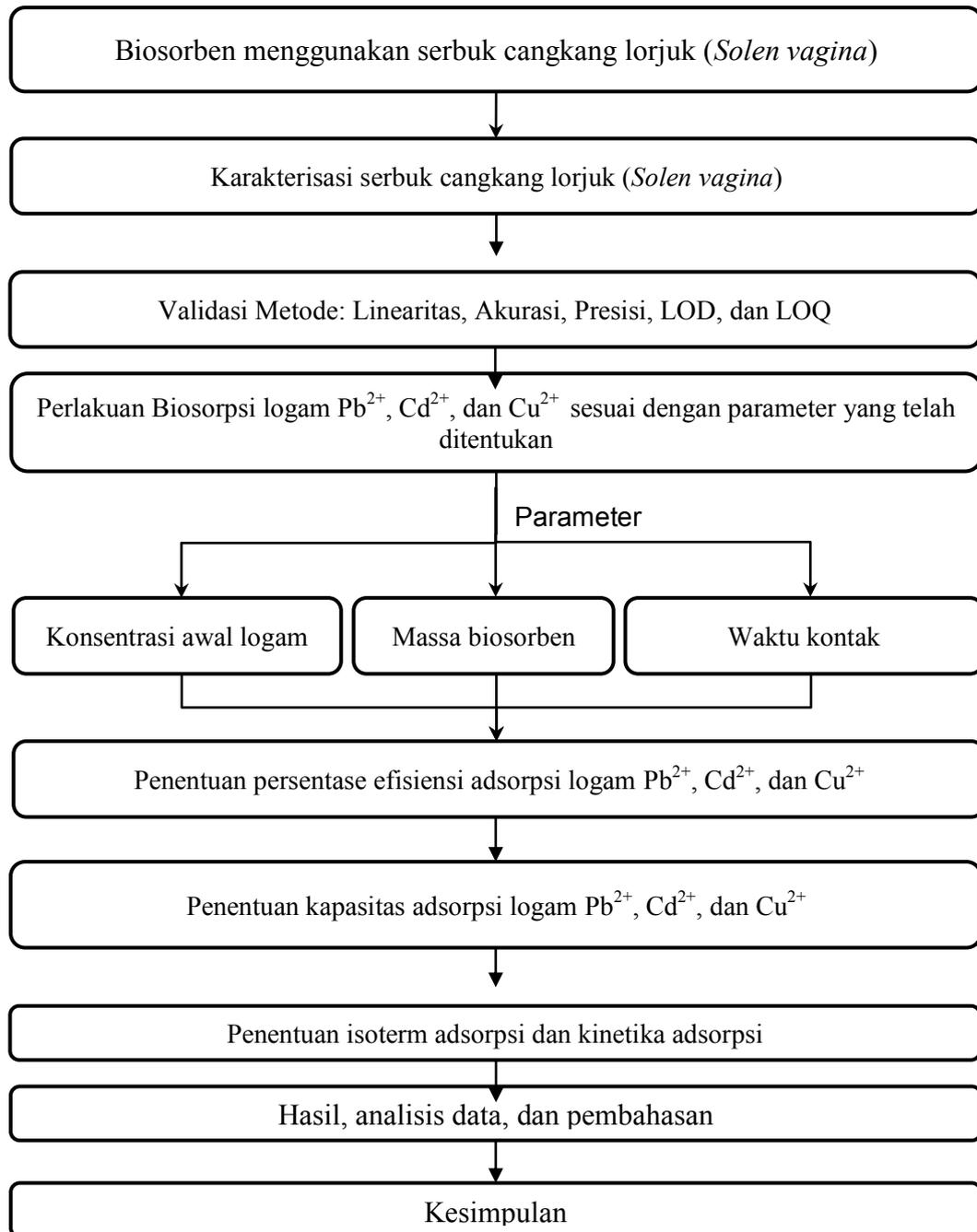
m = Jumlah biosorben (g)

4.11.3 Analisis Pengaruh Parameter terhadap Proses Biosorpsi

Data persentase efisiensi dan kapasitas adsorpsi yang telah diperoleh dari penelitian, dianalisis secara statistik menggunakan program SPSS 16.0 untuk menguji perbedaan rata-rata nilai. Terdapat beberapa syarat suatu data termasuk golongan parametrik, bila: terdistribusi normal, variasi data yang homogen, dan jenis skala pengukuran data berupa interval atau rasio. Pertama, dilakukan uji normalitas dengan *Saphiro Wilk* (sampel ≤ 50) dan uji homogenitas untuk mengetahui data tersebut termasuk golongan parametrik atau *non*-parametrik. Apabila data termasuk golongan parametrik maka analisis dapat dilanjutkan dengan menggunakan *Multivariate ANOVA* (MANOVA) dan data *non*-parametrik dianalisis menggunakan Kruskal Wallis. Hasil signifikansi yang diperoleh untuk mengetahui ada atau tidak perbedaan bermakna antara variasi parameter (waktu kontak, massa biosorben, dan konsentrasi awal logam berat) terhadap respon efisiensi dan kapasitas adsorpsi logam Pb^{2+} , Cd^{2+} , dan Cu^{2+} oleh serbuk cangkang lorjuk.

Analisis data terakhir dapat menggunakan *Post Hoc Test* untuk mengetahui adanya signifikansi antar perlakuan. Apabila data tersebut homogen, maka dapat digunakan uji *Bonferroni*. Sedangkan bila data tersebut tidak homogen maka dapat menggunakan uji *Games-Howell*. Nilai signifikan dalam penelitian ini adalah $\alpha < 0,05$ atau derajat keberterimaan 95%. Kesimpulannya maka H_0 ditolak dan H_a diterima dengan hipotesis, $H_0 =$ tidak ada perbedaan bermakna dan $H_a =$ ada perbedaan bermakna. Pengambilan keputusan jika nilai $p > \alpha$ maka H_0 diterima, sedangkan jika nilai $p < \alpha$ maka H_0 ditolak.

4.12 Kerangka Operasional



Gambar 4.1. Kerangka operasional Biosorpsi logam Pb²⁺, Cd²⁺, dan Cu²⁺ menggunakan serbuk cangkang lorjuk (*Solen vagina*)