

**BUKU REFERENSI**

**Hasil Riset Penulis**

**Detoksifikasi Logam Berat di Perairan dan  
Fortifikasi Makanan Ringan dengan Nanokalsium  
dari Kerang Air Tawar Famili Unionidae**



**Penyusun:**

**Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.**

**No. Reg. KOM.1446.00177 2019**

**Penerbit : Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat  
Universitas Pakuan**

**Jalan Pakuan No.1 P.O. BOX 452, Ciheuleut Bogor**

**Telp. (0251) 8380137 Email lppm@unpak.ac.id**

**Detoksifikasi Logam Berat di Perairan dan  
Fortifikasi Makanan Ringan dengan Nanokalsium  
dari Kerang Air Tawar Famili Unionidae**

**Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.**

**Penerbit:  
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat  
Universitas Pakuan**

**BUKU REFERENSI**  
**Hasil Riset Penulis**

**Detoksifikasi Logam Berat di Perairan dan  
Fortifikasi Makanan Ringan dengan Nanokalsium  
dari Kerang Air Tawar Famili Unionidae**

Edisi Cetak Pertama , 2019

- Penyusun : Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.  
Sertifikat Kompetensi Penulis Buku (BNSP)  
No. Reg. KOM.1446.00177 2019
- Editor : Dr. Prasetyorini, M.S.
- Desain Sampul : Richard Raditiyo S.
- Penerbit : Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada  
Masyarakat Universitas Pakuan
- Alamat : Jalan Pakuan No.1, Ciheuleut, Kelurahan  
Tegallega, Kecamatan Bogor Tengah, Kota  
Bogor – 16143 P.O. BOX 452
- Email : [lppm@unpak.ac.id](mailto:lppm@unpak.ac.id)

**ISBN : 978-623-91228-6-7**

**Hak Cipta dilindungi Undang-undang**

**Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, secara elektronik maupun mekanis memfotocopy, merekam atau dengan teknik perekaman lainnya tanpa izin tertulis dari penerbit.**

**DAFTAR ISI**

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>iv</b>
<b>PENGANTAR PENULIS .....</b>	<b>ix</b>
<b>I. Detoksifikasi Logam Berat di Perairan</b>	
<b>Ringkasan .....</b>	<b>11</b>
1. Detoksifikasi Merkuri di Sungai Cikaniki.....	12
2. Pustaka Biofiltrasi HgCl <sub>2</sub> oleh <i>P. exilis</i> .....	14
3. Metode Biofiltrasi HgCl <sub>2</sub> oleh <i>P. exilis</i> .....	16
4. Hasil Biofiltrasi HgCl <sub>2</sub> oleh <i>P. exilis</i> .....	21
5. Kesimpulan Biofiltrasi HgCl <sub>2</sub> oleh <i>P. exilis</i> .....	31
6. Bahan Bacaan .....	32
<b>II. Fortifikasi Makanan Ringan dengan Nanokalsium dari Cangkang Kerang Famili Unionidae</b>	
<b>Ringkasan .....</b>	<b>36</b>
1. Detoksifikasi dan Fortifikasi Nanokalsium Kerang .....	37
2. Pustaka Nanokalsium Cangkang <i>A. woodiana</i> .....	39
3. Metode Nanokalsium Cangkang <i>A. woodiana</i> .....	51
4. Hasil Detoksifikasi dan Fortifikasi Nanokalsium Cangkang <i>A. woodiana</i> .....	72
5. Kesimpulan Detoksifikasi dan Fortifikasi Nanokalsium Cangkang <i>A. woodiana</i> .....	115
6. Bahan Bacaan .....	116

**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Hasil analisis kadar merkuri sampel air I .....	22
2. Hasil analisis kadar merkuri sampel air II .....	23
3. Hasil analisis kadar merkuri sampel air III .....	24
4. Kondisi insang kerang <i>P. exilis</i> .....	25
5. Histologi insang kerang <i>P. exilis</i> .....	26
6. Persentase <i>survival rate</i> (SR) .....	28
7. Persentase <i>growth rate</i> (GR) .....	29
8. Pembuatan tepung cangkang <i>A. woodiana</i> .....	56
9. Pembuatan nanokalsium cangkang <i>A. woodiana</i> .....	61
10. Tiga dimensi permukaan serbuk nanokalsium.....	66
11. Pembuatan granul instan nanokalsium .....	70
12. Pemeliharaan tikus dengan pakan standar dan minuman	87
13. Pembuatan tiga dosis suspensi Nano Ca .....	90
14. Sando lambung alat pencekakan Nano Ca .....	91
15. Pencekakan Nano Ca pada tikus .....	92
16. Induksi Hg asetat (A) terhadap tikus percobaan secara intraperitoneal (B).....	93
17. Pengambilan serum dan plasma darah (A) dan organ hati, ginjal, paru, limpa dan jantung (B) .....	94

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
18. Analisis histopatologis organ hati, ginjal, paru, Limpa dan jantung tikus percobaan.....	97
19. Analisis Hg plasma dan serum darah tikus .....	99
20. Formula uji organoleptik <i>tortilla chips</i> .....	104
21. Hasil uji organoleptik aroma .....	105
22. Hasil uji organoleptik rasa.....	105
23. Hasil uji organoleptik kerenyahan.....	106
24. Hasil uji organoleptik warna .....	107
25A. Diagram analisa ketersediaan kalsium .....	110
25B. Pengujian Bioavailabilitas Ca metode dialisis .....	111

**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Formulasi granul instan .....	66
2. Hasil analisis mineral granul instan instan <i>A. woodiana</i> .....	78
3. Data bobot badan tikus .....	80
4. Data proksimat pakan tikus .....	84
5. Hasil skoring organ hati, ginjal, paru, limpa dan jantung tikus.....	97
6. Hasil analisis Hg plasma dan serum darah tikus .....	99
7. Formulasi adonan <i>tortilla chips</i> .....	102
8. Bioavailabilitas dan kontribusi AKG kalsium .....	114

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Lampiran</b>	<b>Halaman</b>
1. Riwayat hidup penulis .....	118
2. Sertifikat Kompetensi Penulis (BNSP).....	119



## **PENGANTAR PENULIS**

Buku berjudul ***Detoksifikasi Logam Berat di Perairan dan Fortifikasi Makanan Ringan dengan Nanokalsium dari Kerang Air Tawar Famili Unionidae*** ini diharapkan menjadi salah satu referensi bagi dosen dan peneliti dalam meningkatkan kemampuan akademik khususnya dalam bidang ilmu Toksikologi Lingkungan.

Buku referensi ini merupakan hasil riset yang dilakukan oleh penulis selama tiga tahun (2013 – 2015) dengan pendanaan DPRM Kemenristekdikti. Terbitnya buku ini diharapkan dapat membantu kompetensi mahasiswa untuk mendalami bioekologi kerang air tawar famili Uninodae dan kemampuannya untuk mendetoksifikasi logam berat limbah yang dibuang ke dalam perairan. Buku ini juga dilengkapi dengan uji detoksifikasi merkuri dengan hewan uji tikus serta pemanfaatan kerang air tawar menjadi nanokalsium dan pengembangannya menjadi fortifikan makanan ringan.

Kami menyadari masih terdapat kekurangan dalam penyusunan buku ini, untuk itu kritik dan saran terhadap penyempurnaan buku ini sangat diharapkan. Semoga buku ini dapat memberi manfaat khususnya bagi dosen dan peneliti yang membutuhkannya.

Bogor, 29 Agustus 2019

Penulis

## **I. DETOKSIFIKASI LOGAM BERAT DI PERAIRAN**

## **RINGKASAN**

Pencemar merkuri limbah tambang emas diduga merupakan penyebab kematian banyak biota di sungai Cikaniki Kabupaten Bogor, meski belum dilaporkan secara resmi. Di hulu sungai ini terdapat pertambangan emas resmi milik PT Aneka Tambang, dan beberapa pertambangan emas tidak resmi yang biasa disebut pertambangan emas tanpa ijin (PETI). Pencemaran merkuri di sungai Cikaniki sangat membahayakan, karena sungai ini merupakan salah satu sumber bahan baku air bersih PDAM Bogor dan Tangerang. Kehadiran merkuri terus menerus di perairan menimbulkan stres (cekaman) bagi biota air. Penelitian ini akan mengevaluasi pemanfaatan kerang *Pilsbryconcha exilis* untuk bioremediasi perairan yang tercemar merkuri. Hasil penelitian ini diharapkan memberi kontribusi positif untuk bioremediasi lingkungan untuk evaluasi kualitas perairan, dalam rangka menjaga keamanan bahan pangan yang berasal dari perairan. Metode ini dapat diterapkan di berbagai daerah di Indonesia, yang memiliki kasus pencemaran sungai, seperti terjadi di Cikaniki Bogor. Penelitian ini bertujuan mengatasi masalah strategis berskala nasional tentang ketahanan dan keamanan pangan, khususnya bahan pangan yang berasal dari perairan tercemar logam berat, dan akan melibatkan instansi terkait yaitu Badan Lingkungan Hidup (BLH) Kabupaten Bogor.

Kata kunci: bioremediasi, merkuri, *Pilsbryconcha exilis*.

## **1. DETOKSIFIKASI MERKURI DI SUNGAI CIKANIKI**

Pencemaran sungai di Indonesia seringkali terjadi sebagai dampak negatif kegiatan manusia, yang mengakibatkan penurunan kualitas perairan sungai. Salah satu kasus pencemaran sungai yang sangat membahayakan kehidupan biota air dan manusia, adalah limbah merkuri dari kegiatan pertambangan emas. Sebagai contoh, kasus pencemaran Sungai Cikaniki, anak Sungai Cisadane di Kabupaten Bogor. Di bagian hulu Sungai Cikaniki terdapat pertambangan emas resmi milik PT Aneka Tambang (ANTAM), dan beberapa pertambangan tidak resmi yang disebut pertambangan emas tanpa ijin (PETI), sementara bagian hilir sungai Cisadane menjadi bahan baku air minum oleh PDAM Kota Bogor dan Tangerang. Sungai Cikaniki yang tercemar merkuri (Suryono *dkk.*, 2010) menyebabkan kematian pada ikan baung, dan insekta (Yoga *dkk.*, 2014; Paryono *dkk.*, 2007), serta membahayakan kesehatan pekerja tambang di sungai tersebut (Junita, 2013).

Respons biota terhadap akumulasi logam berat adalah dengan melakukan detoksifikasi secara fisiologis, namun sebenarnya respons lebih awal terjadi pada level molekuler (Gupta & Singh, 2011). Respons molekuler dapat diidentifikasi, antara lain dari sintesis protein metallothionein (MT), ketika biota mengalami cekaman lingkungan. Ekspresi gen MT berupa

sintesis protein MT teridentifikasi pada kerang laut *Anadara antiquata* yang diinduksi merkuri (Prihatini, 2013), *Anadara granosa* yang diinduksi tembaga (Kok-Kee *et.al.* 2009), dan kerang air tawar *Anodonta woodiana* yang diinduksi timbal (Kartikaningsih *dkk.*, 2013).

Potensi kerang air tawar *Anodonta woodiana* sebagai biofilter merkuri telah diteliti oleh Khasyar *dkk.* pada tahun 2012. Kerang air tawar lainnya yaitu *Pilsbryconcha exilis* tersebar luas di Indonesia dan belum banyak dimanfaatkan untuk biofiltrasi, maupun bioremediasi perairan tercemar. Penelitian ini bertujuan memaksimalkan pemanfaatan *P. exilis* untuk bioremediasi perairan tercemar merkuri, dan mengidentifikasi ekspresi gen MT sebagai biomarker untuk pemantauan perairan tercemar merkuri. Penelitian ini merupakan bagian dari peta jalan penelitian tentang aspek-aspek ekofisiologi dan biomolekuler kerang, untuk kurun waktu tahun 2010-2020.

Peta jalan penelitian tersebut diharapkan dapat menyediakan informasi yang komprehensif, dan memaksimalkan peran ekologis kerang sebagai agen biofiltrasi dan bioremediasi perairan, selain dimanfaatkan sebagai bahan pangan.

Penelitian ini direncanakan berlangsung selama tiga tahun. Pada tahun pertama akan diuji bioremediasi sungai tercemar merkuri, melalui biofiltrasi oleh kerang *P. exilis*.

Penelitian memakai pendekatan ekofisiologi, dan histologis, yaitu dengan uji biofiltrasi, analisis korelasi kandungan merkuri di perairan dan pada kerang, serta analisis histopatologis tubuh kerang akibat akumulasi merkuri. Penelitian tahun ke dua menggunakan pendekatan molekuler, yaitu identifikasi protein metallothionein (MT) pada *P. exilis* dari sungai Cikaniki, dan korelasinya dengan kandungan merkuri di lokasi tersebut. Penelitian tahun ke tiga tetap menggunakan pendekatan molekuler, yaitu analisis ekspresi gen MT dengan induksi merkuri pada skala laboratorium, yang mengindikasikan respons detoksifikasi tubuh kerang akibat bioakumulasi merkuri.

## 2. PUSTAKA BIOFILTRASI $HgCl_2$ OLEH *P. exilis*

### **Kerang *Pilsbryconcha exilis* dan pencemar merkuri di sungai**

Limbah merkuri dari kegiatan pertambangan emas (terutama kegiatan PETI) menjadi penyebab utama pencemaran Sungai Cikaniki. Dalam proses pemisahan bijih emas dari tanah, digunakan merkuri yang merupakan unsur logam bersifat toksik. Senyawaan merkuri di perairan dijumpai dalam beragam bentuk dan spesies, yang memengaruhi mobilitas, bioavailabilitas, dan toksisitasnya. Merkuri memiliki afinitas tinggi terhadap lipid, sehingga sangat mudah

terakumulasi di tubuh, dibandingkan logam lain (Lu *et.al.* 2010). Akumulasi merkuri di ekosistem mengalami biomagnifikasi sejalan dengan rantai makanan, sehingga sangat berbahaya saat dikonsumsi manusia sebagai konsumen akhir.

Kerang hidup menetap, dan sangat rentan terpapar merkuri di perairan, oleh karenanya ideal dijadikan hewan uji dalam studi pencemaran merkuri. Kerang air tawar *Pilsbryconcha exilis* tersebar cukup luas di Indonesia (Jawa, Kalimantan, Sumatera), Kamboja, Laos, Malaysia, Thailand, dan Vietnam (IUCN, 2014), namun belum banyak dimanfaatkan potensinya. Sebagai hewan bentos, kerang rentan terhadap dampak negatif kegiatan antropogenik (Araujo *et.al.*, 2009), namun kerang juga memiliki plastisitas fenotipik untuk beradaptasi dengan lingkungannya (Zieritz *et.al.*, 2010).

Kerang sering dimanfaatkan untuk biomonitoring perairan karena berperan bagaikan "*environmental logbook*", yang efektif mencatat semua perubahan dalam habitatnya seiring perjalanan waktu. Karena memiliki cara makan *filter feeding*, logam berat di perairan mudah terbawa masuk ke tubuh kerang dan terakumulasi, terutama di insang dan hepatopankreas. Karakteristik biofiltrasi ini menyebabkan kerang potensial dimanfaatkan untuk pemulihan (bioremediasi) perairan yang tercemar logam berat (Grabarkiewicz & Davis, 2008; Misra & Mukhapadhyay, 2008; Rahayu & Rustiani, 2013).

Penelitian ini bertujuan menyediakan pilihan solusi mengatasi masalah strategis berskala nasional, yaitu penanganan sungai tercemar merkuri. Hasil ini diharapkan dapat menegaskan peran gen MT dalam regulasi detoksifikasi merkuri pada tubuh kerang, yang memungkinkan mereka mampu beradaptasi, dan kemudian memperbaiki perairan yang tercemar merkuri. Penelitian ini berdampak positif, antara lain memaksimalkan pemanfaatan *P. exilis* untuk bioremediasi limbah merkuri di sungai, sehingga dapat memulihkan keamanan bahan pangan dari perairan tersebut; serta penerapan biomarker metallothionein dalam program pemantauan dan penilaian perairan sungai yang tercemar merkuri di Indonesia.

### **3. METODE BIOFILTRASI HGCL<sub>2</sub> OLEH *P. exilis***

#### **Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian tahun I akan menganalisis sampel *P. exilis* dari sungai Cikaniki yang tercemar merkuri. Targetnya adalah menetapkan efektivitas biofiltrasi oleh *P. exilis*, korelasi kandungan merkuri di sungai dan di tubuh kerang, serta perubahan morfologis maupun histopatologis kerang akibat akumulasi merkuri.



Lokasi penelitian di lapangan ditentukan secara *purposive* pada Sungai Cikaniki yang tercemar merkuri. Penentuan posisi lokasi pengambilan contoh menggunakan alat *Global Positioning System* (GPS). Pengambilan contoh air dan kerang, akan dilakukan di daerah Cisarua, Curug Bitung, dan Lukut, di bantaran Sungai Cikaniki, Kecamatan Nanggung, Kabupaten Bogor. Jumlah kerang yang diambil sebagai sampel sebanyak 120 ekor untuk tiap lokasi.

**a. Penetapan konsentrasi merkuri pada contoh air dan kerang**

Pengukuran kandungan merkuri di air diawali dengan mengambil 1 liter contoh air dari setiap stasiun pengamatan. Sebanyak 250 ml contoh air disaring menggunakan kertas saring Whatman membran selulosa nitrat (pori 0,45  $\mu\text{m}$ ). Padatan partikulat yang tertahan kertas saring dikeringkan pada suhu 60°C selama 24 jam, lalu ditimbang. Analisis kandungan merkuri pada contoh air hasil penyaringan mengikuti metode Smoley (1992), sedangkan pada contoh kerang, mengacu pada Akagi & Nishimura (1991).

Analisis konsentrasi merkuri dilakukan pada contoh insang  $\pm 2$  gr, yang ditambahkan 2 ml HNO<sub>3</sub> dan 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kemudian dimasukkan ke dalam microwave untuk didestruksi pada suhu 0°C selama 15-20 menit. Contoh ini lalu dimasukkan ke labu ukur, dan volumenya ditetapkan hingga 50 ml dengan

aquades lalu dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 253,7 nm tanpa nyala (*flameless*). Langkah berikutnya adalah melakukan analisis korelasi antara kandungan merkuri di air dan di tubuh kerang.

**b. Penetapan kondisi insang**

Perubahan pada mikroanatomi insang diamati dengan mencermati ada tidaknya edema, hyperplasia, fusi lamella, nekrosis hingga atropi pada insang (Fitriawan *dkk.*, 2011) dengan cara pembuatan sediaan jaringan insang, untuk menganalisis jenis, dan persentase kerusakan pada jaringan, menggunakan mikroskop stereo. Dihitung persentase individu kerang yang mengalami degradasi insang, dari setiap stasiun pengamatan. Tahap berikutnya dilakukan analisis korelasi antara konsentrasi merkuri di air dengan persentase kerang yang mengalami degradasi insang, dan kerusakan jaringan insang, untuk penetapan pola, dan keeratan korelasinya.

**c. Penetapan efektivitas biofiltrasi merkuri oleh kerang**

Uji biofiltrasi ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri atas tiga perlakuan dan dua ulangan. Penelitian ini bertujuan mengamati respons kerang pada medium air bersih yang diberi larutan  $HgCl_2$ , dalam akuarium berkapasitas 10 liter. Digunakan enam akuarium yang diberi substrat pasir halus, dan aerator, dengan pengaturan sebagai berikut :  
Perlakuan 1 yaitu: 15 ekor kerang *P. exilis* + 1 ppm larutan  $HgCl_2$ .

Perlakuan 2 yaitu: 30 ekor kerang *P. exilis* + 1 ppm larutan HgCl<sub>2</sub>.

Perlakuan 3 yaitu: 60 ekor kerang *P. exilis* + 1 ppm larutan HgCl<sub>2</sub>.

Kerang *P. exilis* akan diteliti selama 10 minggu dengan mengamati kondisi air dan tubuh kerang selama perlakuan, untuk menganalisis kandungan merkuri dalam air digunakan peralatan *Atomic Absorption Spectrophotometer* (AAS). Percobaan dilakukan selama 5 minggu, dengan tingkat konsentrasi HgCl<sub>2</sub> 1 ppm. Selama pemeliharaan, kerang diberi pakan kultur plankton, dan pelet.

#### **d. Analisis Data**

Penghitungan kesintasan kerang (*survival rate*, SR) memakai rumus (Zounneveld *et.al.*, 1991):

$$SR = \frac{N_t}{N_0} \times 100\%$$

Keterangan: SR = *survival rate* (%).

N<sub>t</sub>= jumlah kerang hidup pada akhir pemeliharaan.

N<sub>0</sub>= jumlah kerang hidup pada awal pemeliharaan.

Pengukuran laju pertumbuhan harian (*growth rate*, GR) menggunakan rumus (Zounneveld *et. al.*, 1991), sebagai berikut:

$$\alpha = \left[ \frac{W_t - W_0}{W_0} \right] \times 100$$

Keterangan :                    α = laju pertumbuhan harian (%)

W<sub>t</sub> = bobot akhir (g)

W<sub>0</sub> = bobot awal (g)

t = waktu

Seluruh data dianalisa dengan menggunakan IBM SPSS 23 setelah dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji dari Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-wilk. Data tiga perlakuan diolah dengan menggunakan uji anova satu arah yang dilanjutkan dengan uji Bonferoni untuk menentukan batas kemaknaan dengan nilai  $p < 0,05$  karena data untuk kelompok perlakuan berdistribusi normal. Sedangkan untuk membandingkan derajat degenerasi dan nekrosis dari jaringan insang dipakai uji statistik non parametric yaitu uji Mann Whitney.

Berdasarkan hasil penelitian akan diperoleh data mengenai kemampuan kerang *P. exilis* sebagai biofilter yang meliputi jumlah individu yang berpotensi menurunkan kadar Hg sampai nilai ambang batas (NAB) normal, kecepatan dan tingkat penurunan konsentrasi merkuri dan tingkat kelangsungan hidup serta laju pertumbuhan dalam media percobaan.

#### **e. Fisika dan kimia perairan dan aplikasi bioremediasi**

Parameter fisika kimia perairan yang diukur, yaitu DO, pH, dan suhu. Pengukuran dilakukan 2 minggu sekali. Pada akhir tahun I penelitian akan dilakukan aplikasi bioremediasi merkuri oleh *P. exilis* di sungai. Penerapannya bekerjasama dengan Badan Lingkungan Hidup Kabupaten Bogor pada tiga lokasi, yaitu hulu, tengah dan hilir Sungai Cikaniki.

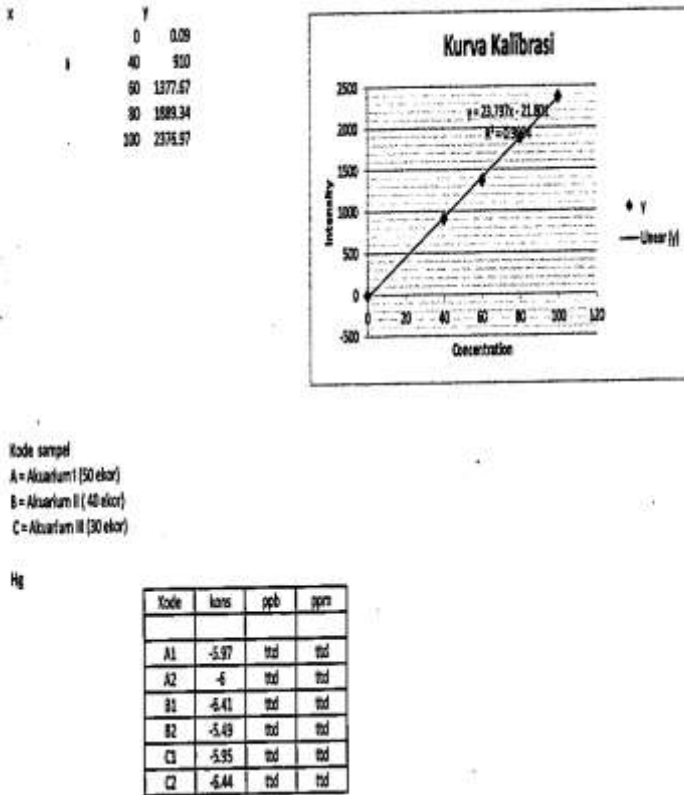
Kerang *P. exilis* dengan jumlah optimum yang dihasilkan dari penelitian efektivitas biofiltrasi, ditransplantasi di bagian hulu, tengah dan hilir Sungai Cikaniki menggunakan wadah dan keranjang. Keranjang berisi kerang tersebut dimasukkan ke dalam badan sungai, diikat dengan tambang, dan diberi pelampung kemudian dibiarkan selama satu bulan. Selanjutnya sampel air sungai dan kerang *P. exilis* yang ditransplantasi dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengukuran kadar merkuri dengan metode AAS. Hasil pengukuran di laboratorium pada kerang dari perairan yang tidak tercemar (Situ Gede, Bogor) dibandingkan dengan pengukuran pada akhir pemaparan di sungai Cikaniki. Hasil yang diharapkan dari aplikasi bioremediasi ini kerang *P. exilis* terbukti kemampuannya sebagai biofilter pencemar merkuri di perairan Cikaniki selama durasi pemaparan.

#### **4. HASIL BIOFILTRASI $HgCl_2$ OLEH *P. exilis***

##### **a. Penetapan konsentrasi merkuri pada contoh air dan kerang**

Analisis kandungan merkuri pada contoh air hasil penyaringan mengikuti metode Smoley (1992), sedangkan pada contoh kerang, mengacu pada Akagi & Nishimura (1991). Analisis konsentrasi merkuri dilakukan pada contoh dianalisa dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom pada

panjang gelombang 253,7 nm tanpa nyala (flameless). Hasil analisis kadar merkuri sampel air tercantum dalam Gambar 1.



Gambar 1. Hasil analisis kadar merkuri sampel air I

Langkah berikutnya adalah melakukan analisis korelasi antara kandungan merkuri di air dan di tubuh kerang.

*Detoksifikasi & Fortifikasi Nanokalsium Kerang*

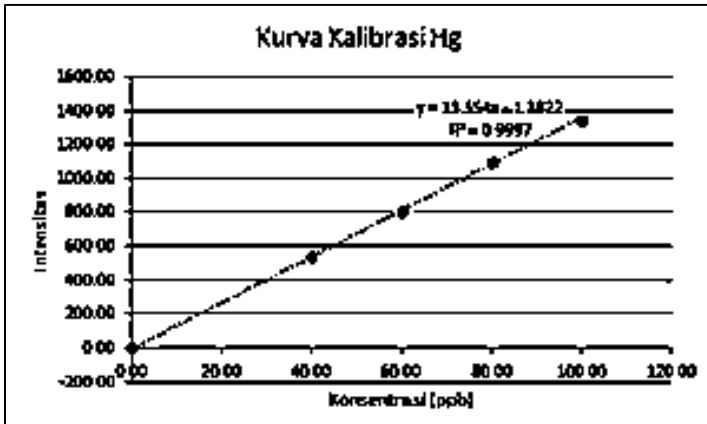
kode sampel  
 I = dasar s4  
 II = dasar s3  
 III = arak suplai s5  
 IV = s4  
 V = s2  
 VI = s3  
 VII = Hg01

Kode	bbt	vol	fp	kons	fk	ppb	ppm
blk tp	-	50	-	6.15	-	-	-
I a	1.2708	50	-	61.00	1.5097	3623.38	3.6234
I b	1.2614	50	-	58.06	1.5097	3474.44	3.4744
II a	1.5138	50	-	42.80	1.6139	2281.53	2.2815
II b	1.5113	50	-	42.63	1.6139	2276.29	2.2762
III a	1.7238	50	-	-43.36	1.5699	-1974.44	-1.9744
III b	1.7529	50	-	-58.00	1.5699	-2600.21	-2.6002
IV a	-	-	-	27.09	1.0000	27.09	0.0271
IV b	-	-	-	27.09	1.0000	27.09	0.0271
V a	-	-	-	83.77	1.0000	83.77	0.0838
V b	-	-	-	84.19	1.0000	84.19	0.0842
VI a	-	-	-	12.70	1.0000	12.70	0.0127
VI b	-	-	-	11.58	1.0000	11.58	0.0116
VII a	-	-	10a	43.72	1.0000	437.2	0.437
VII b	-	-	10a	47.19	1.0000	471.00	0.471

Kode	bbt	vol	fp	kons	fk	ppb	ppm
blk	-	50	-	-7.81	-	-	-
1a	1.3525	50	-	-5.79	1.5097	-323.15	-0.3231
1b	1.7419	50	-	-4.65	1.5097	-201.51	-0.2015
2	1.2820	50	-	-5.51	1.6139	-283.88	-0.2839
2	1.2820	50	-	-5.42	1.6139	-341.16	-0.3412
3	1.0474	50	-	-6.84	1.5699	-512.61	-0.5126
3	1.0474	50	-	-7.60	1.5699	-569.56	-0.5696
4	1.3676	50	-	-4.30	1.0000	-157.21	-0.1572
4	1.3676	50	-	-3.34	1.0000	-122.11	-0.1221
5	1.2812	50	-	-10.08	1.0000	-393.38	-0.3934
5	1.2812	50	-	-9.81	1.0000	-382.84	-0.3828
6	1.2933	50	-	-7.45	1.0000	-288.02	-0.2880
6	1.2933	50	-	-8.91	1.0000	-344.47	-0.3445

Gambar 2. Hasil analisis kadar merkuri sampel air II

Standards	concentration	Intensity
Blank	0.00	0.00
Standard 2	40.00	535.45
Standard 3	60.00	808.25
Standard 4	80.00	1099.09
Standard 5	100.00	1345.3

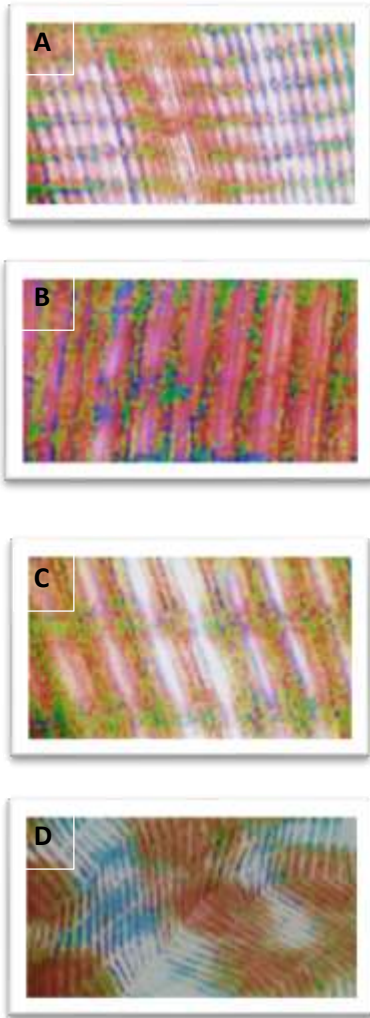


Gambar 3. Hasil analisis kadar merkuri sampel air III

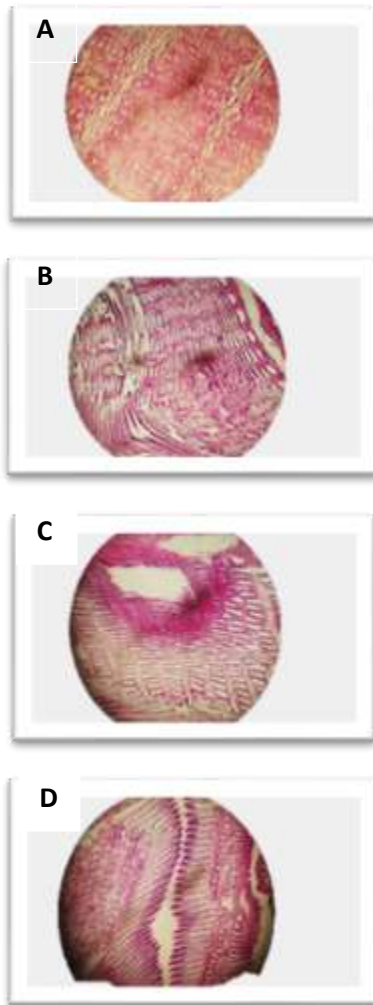
**b. Penetapan kondisi insang**

Perubahan pada mikroanatomi insang diamati dengan mencermati ada tidaknya edema, hyperplasia, fusi lamella, nekrosis hingga atrofi pada insang (Fitriawan dkk., 2011).





Gambar 4. Kondisi insang kerang *P. exilis* kontrol (A); perlakuan 1 (30 ekor, B); perlakuan 2 (40 ekor, C) dan perlakuan 3 (50 ekor, D)



Gambar 5. Histologis insang kerang *P. exilis* kontrol (A); perlakuan 1 (30 ekor, B); perlakuan 2 (40 ekorC) dan perlakuan 3 (50 ekor, D)

Tahap berikutnya dilakukan analisis korelasi antara konsentrasi merkuri di air dengan persentase kerang yang

mengalami degradasi insang, dan kerusakan jaringan insang, untuk penetapan pola, dan keeratan korelasinya.

**c. Penetapan efektivitas biofiltrasi merkuri oleh kerang**

Uji biofiltrasi ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri atas tiga perlakuan dan dua ulangan. Penelitian ini bertujuan mengamati respons kerang pada medium air bersih yang diberi larutan  $\text{HgCl}_2$ , dalam akuarium berkapasitas 10 liter. Digunakan enam akuarium yang diberi substrat pasir halus, dan aerator, dengan pengaturan sebagai berikut :

Perlakuan 1 yaitu: 15 ekor kerang *P. exilis* + 1 ppm larutan  $\text{HgCl}_2$ .

Perlakuan 2 yaitu: 30 ekor kerang *P. exilis* + 1 ppm larutan  $\text{HgCl}_2$ .

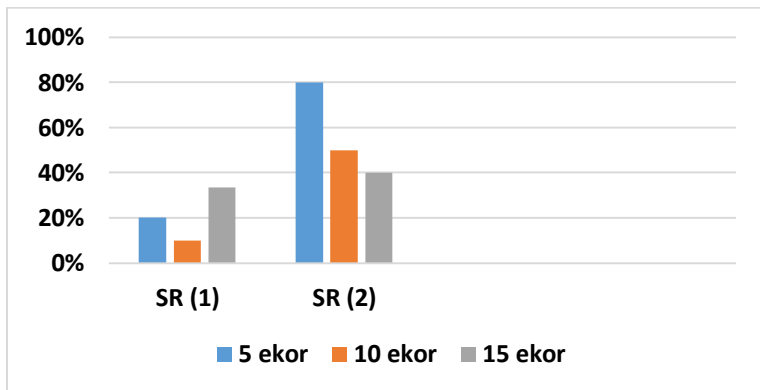
Perlakuan 3 yaitu: 60 ekor kerang *P. exilis* + 1 ppm larutan  $\text{HgCl}_2$ .

Kerang *P. exilis* akan diteliti selama 10 minggu dengan mengamati kondisi air dan tubuh kerang selama perlakuan, untuk menganalisis kandungan merkuri dalam air digunakan peralatan Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS). Percobaan dilakukan selama 5 minggu, dengan tingkat konsentrasi  $\text{HgCl}_2$  1 ppm. Selama pemeliharaan, kerang diberi pakan kultur plankton, dan pelet.

**d. Analisis Data**

**Kelangsungan Hidup (*Survival Rate*)**

Kelangsungan hidup kijing selama proses perlakuan pada minggu pertama banyak yang mengalami kematian hal ini disebabkan oleh adaptasi dari tempat sebelumnya yang belum diberi perlakuan, dan masih dalam tahap proses aklimatisasi selama 1 minggu, namun setelah berjalan minggu kedua, ketiga, keempat, dan kelima jumlah kijing yang mati berangsur-angsur mengalami penurunan (Gambar 6).

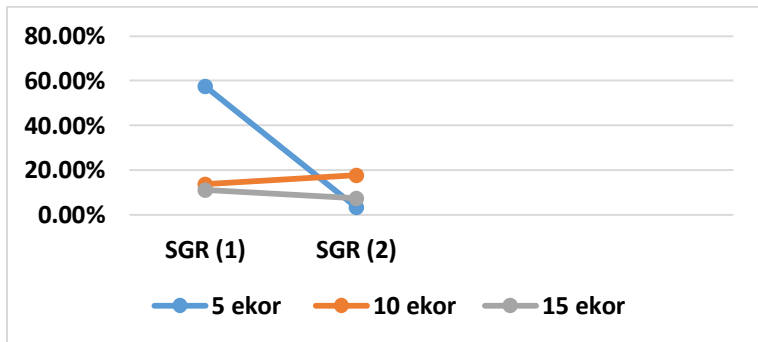


Gambar 6. Persentase *Survival Rate* (SR) *P. exilis*

### **Laju Pertumbuhan Harian (*Growth Rate*)**

Laju pertumbuhan harian dipakai untuk menghitung persentase berat kijing per hari, dari hasil penelitian diketahui bahwa kijing yang memiliki persentase pertumbuhan harian yang paling baik yaitu kijing dengan jumlah 5 ecor pada pengulangan pertama sebesar 57,6% dan yang paling rendah yaitu pada kijing dengan jumlah 5 ecor pada pengulangan kedua sebesar 3,42% (Gambar 7). Hal ini dapat dipengaruhi

oleh persaingan dalam mencari makan di akuarium dan jumlah kijing semakin banyak akan mempengaruhi laju pertumbuhan hariannya.



Gambar 7. Persentase *Growth Rate* (GR) *P. exilis*

#### e. Fisika dan kimia perairan dan aplikasi bioremediasi

Parameter fisika kimia perairan yang diukur, yaitu DO, pH, dan suhu. Pengukuran dilakukan 2 minggu sekali.

#### Oksigen Terlarut (DO)

Oksigen terlarut selama dalam penelitian menunjukkan kisaran antara 6,4 - 11,7 mg/L Tiap akuarium berbeda - beda kandungan oksigen terlarutnya, hal ini dikarenakan faktor kurangnya gelembung udara yang dihasilkan oleh aerator karena selang untuk keluarnya gelembung udara hanya ada satu saluran, kemudian pemberian pakan serbuk *Spirulina* sp. yang membuat kadar oksigen terlarut sedikit demi sedikit berkurang karena jumlah *Spirulina* sp. semakin bertambah,

ditambah dengan banyaknya kijing yang mati, kematian kijing tersebut biasanya diikuti dengan terlepasnya bagian organ dalam kijing yang mudah hancur jika terlalu lama di air sehingga menimbulkan kekeruhan pada air akuarium tersebut.

### **pH dan Suhu**

Mengukur pH menggunakan pH indikator, pH air pada tiap akuarium berbeda - beda yang berkisar antara 7,0 - 8,0. Hal ini disebabkan oleh aktivitas dari kijing yang mengeluarkan kotoran (*feces*) setiap kali menyerap makanan, serta pemberian pakan fitoplankton *Spirulina* sp. serbuk yang dapat menaikkan pH pada air. Selama penelitian berlangsung suhu yang diukur berkisar 25°C - 26,5°C hal ini masih memungkinkan kijing untuk hidup, menurut (Komarawidjaja,2006) kijing mampu bertahan hidup pada kondisi kekurangan oksigen dengan suhu berkisar antara 11°C - 29°C.

Pada akhir tahun I penelitian telah dilakukan aplikasi bioremediasi merkuri oleh *P. exilis* di sungai. Penerapannya bekerjasama dengan Badan Lingkungan Hidup Kabupaten Bogor pada tiga lokasi, yaitu hulu, tengah dan hilir Sungai Cikaniki. Kerang *P. exilis* dengan jumlah optimum yang dihasilkan dari penelitian efektivitas biofiltrasi, ditransplantasi di bagian hulu, tengah dan hilir Sungai Cikaniki menggunakan wadah dan keranjang. Keranjang berisi kerang tersebut dimasukkan ke dalam badan sungai, diikat dengan tambang, dan diberi pelampung kemudian dibiarkan selama satu bulan.

Selanjutnya sampel air sungai dan kerang *P. exilis* yang ditransplantasi dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengukuran kadar merkuri dengan metode AAS.

Hasil pengukuran di laboratorium pada kerang dari perairan yang tidak tercemar (Situ Gede, Bogor) dibandingkan dengan pengukuran pada akhir pemaparan di sungai Cikaniki. Hasil dari aplikasi bioremediasi ini kerang *P. exilis* terbukti kemampuannya sebagai biofilter pencemar merkuri di perairan Cikaniki selama durasi pemaparan.

## **5. KESIMPULAN BIOFILTRASI HgCl<sub>2</sub> OLEH *P. exilis***

### **Kesimpulan**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kijing lokal (*Pilsbryconcha exilis*) berpotensi sebagai biofilter terhadap kadmium (Cd) dengan konsentrasi 3 ppm, dengan jumlah 50 ekor lebih berpotensi menurunkan kadar konsentrasi merkuri (Hg) hingga -0,060 ppm pada pengulangan pertama dan -0,042 ppm pada pengulangan kedua. Jumlah kijing 50 ekor sangat mempengaruhi kelangsungan hidup (*Survival rate*) dan jumlah kijing 5 ekor sangat mempengaruhi laju pertumbuhan harian (*Sustainable Growth Rate*), serta faktor fisika dan kimia yang menjadi parameter berada dalam kisaran yang mendukung untuk

pertumbuhan dan ketahanan kijing hidup dalam kondisi dengan polutan merkuri(Hg).

### **Saran**

Perlu dilakukan penelitian serupa dengan menggunakan jenis kijing yang berbeda dan kadar logam yang berbeda untuk mengetahui berapa banyak kadar logam yang dapat diserap.

## **6. BAHAN BACAAN**

- Araujo, R., C. Toledo, A. Machordom. 2009. Redescription of *Unio gibbus*. A West palaeartic freshwater mussel with hookless glochidia. *Malacologia* 51(1): 131-141.
- Butet, N.A., D. D. Solihin, K. Soewardi, A. Saefuddin. 2014. *Actin* gene from blood cockle *Anadara granosa* as a potential housekeeping gene for gene expression analysis. *Emir. J. Food Agric.* 26 (8): 730-736. doi: 10.9755/ejfa.v26i8.15765.
- Fitriawan, F., Sutarno, Sunarto. 2011. Microanatomy alteration of gills and kidneys in freshwater mussel *Anodonta woodiana* due cadmium exposure. *Bioscience* 3 (1): 28-35.
- Grabarkiewicz, J.D., W. S. Davis, 2008. An introduction to freshwater mussels as biological indicators. Including accounts of interior basin, cumberlandian, and Atlantic slope species. United States Environmental Protection Agency. EPA-260-R-08-015.
- Gupta SK, Singh J. 2011. Evaluation of mollusc as sensitive indicator of heavy metal pollution in aquatic system. *The IIOAB Journal* (ISSN:0976-3104). Review Article. Vol. 2. Issue 1: 49-57.



- IUCN. 2014. Red List of Threatened Species ver. 2014.3. Diakses tanggal 2 April 2016 pk. 21.15 WIB.
- Junita, N.R. 2013. Resiko keracunan merkuri (Hg) pada pekerja penambangan emas tanpa izin (PETI) di Desa Cisarua Kecamatan Nanggung Kabupaten Bogor. Skripsi. Universitas Islam Negeri Sjarif Hidayatullah. Jakarta. 74-77.
- Khasyar, R.K, Rahayu, S.Y.S, dan Sudrajat, C. 2012. Potensi Kijing Taiwan (*Anodonta woodiana*) sebagai Biofilter Merkuri. [ejournal.unpak.ac.id](http://ejournal.unpak.ac.id).
- Komarawidjaja, W. 2006. Kajian adaptasi kijing *Pilsbryoconcha exilis* sebagai langkah awal pemanfaatannya dalam biofiltrasi pencemar organik di perairan waduk. *J.Tek.Ling.* 7 (2): 160-165.
- Lu, H., J. Yang, J. Gan. 2010. Trace elements accumulation in bivalve mussels *Anodonta woodiana* from Taihu lake, China. *Arch. Environ.Contam.Toxicol.* 59: 593-601.
- Misra, G. and P. K. Mukhapadhyay. 2008. Mussel farming: Alternate water monitoring practice. *Aquaculture Asia Magazine.* July-September. 32-34.
- Paryono, E. Riani, D.I. Pradono. 2007. Bioakumulasi merkuri (Hg) pada ikan baung (*Mystus nemurus*) di Sungai Cikaniki, Bogor. *Prosiding Saing Kelautan dan Perikanan Indonesia I.* 17-18 Juli 2007. IPB, Bogor. 170-179.
- Prihatini, W. 2013. Kemampuan adaptif kerang bulu *Anadara antiquata* di perairan tercemar logam berat: aspek biokinetik, ekobiologi, histologi, dan molekuler. Disertasi. Mayor Biosains Hewan, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Rahayu, S.Y.S., E. Rustiani. 2013. Reduksi Kadar Logam Berat dalam Kijing Taiwan *Anodonta woodiana* agar Menjadi Bahan Pangan Konsumsi yang Aman. *Fitofarmaka* 3 (1): 93-100
- Smoley, C.K. 1992. Methods for the determination of metals in environmental samples. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, Ohio.

- Suryono, T., Y. Sudarsoa, Awalina, Yustiawatia, M.S. Syawala. 2010. Status kontaminasi merkuri di ruas Sungai Cikaniki, Jawa Barat. LIMNOTEK 17 (1): 37-48.
- Yoga, G.P., D. Lumbanbatu, E. Riani, Y. Wardiatno. 2014. Pengaruh pencemaran merkuri di Sungai Cikaniki terhadap biota Trichoptera (Insekta). LIMNOTEK 21 (1) : 11-20.
- Zounneveld, N., Huisman, E.A., & Boon, J.H. 1991. Prinsip-prinsip Budidaya Ikan. Penerjemah. Pustaka Utama. Gramedia, Jakarta, 318 hlm.

**II. FORTIFIKASI MAKANAN RINGAN DAN UJI  
DETOKSIFIKASI MERKURI PADA TIKUS DENGAN  
NANOKALSIMUM DARI KERANG AIR TAWAR  
FAMILI UNIONIDAE**

## RINGKASAN

Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang lebih kecil perlu dikembangkan untuk memperbesar penyerapan kalsium dalam tubuh. Pada penelitian ini, sumber kalsium yang digunakan dari hewan perairan adalah cangkang Kijing Taiwan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan rendemen kalsium yang dihasilkan serta menentukan karakteristik nano kalsium yang meliputi morfologi, derajat putih, komponen mineral, dan *particle size*. Penelitian ini meliputi preparasi sampel cangkang kijing, uji proksimat cangkang kijing, serta pembuatan serbuk nano kalsium dengan perlakuan lama ekstraksi terhadap rendemen dan kadar mineral. Tahap selanjutnya yaitu karakterisasi serbuk nano kalsium yang dihasilkan meliputi analisis derajat putih dan analisis ukuran partikel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen optimal diperoleh pada perlakuan ekstraksi 1,5 jam yaitu sebesar 7,50%. Berdasarkan analisis mineral, kadar mineral yang tertinggi pada waktu ekstraksi 1,5 jam adalah kalsium yaitu sebesar 92,0%. Serbuk nano kalsium juga mengandung mineral lainnya yaitu natrium (7,2%), kalium (0,08%), magnesium (0,3%), fosfor (0,11%), mangan (0,03%), seng (0,02%), dan besi (0,01%). Nilai derajat putih serbuk nano kalsium yang dihasilkan adalah 75,36% (skala 100%). Hasil pengukuran partikel dengan menggunakan SEM pada perbesaran 10.000x dan 20.000x menunjukkan bahwa ukuran partikel serbuk nano kalsium yang dihasilkan berkisar 121-430 nm. Hal ini cenderung meningkatkan penyerapan kalsium oleh tubuh. Pemberian suplemen Nano Ca terhadap keracunan merkuri mengurangi penipisan gelar nekrotik dan degenerasi hepatosit. Selain itu, suplementasi nano Ca mengalami penurunan konsentrasi Hg pada baik plasma maupun serum darah tikus. *Tortilla chips* dengan penambahan nano tepung Kijing Taiwan menghasilkan bioavailabilitas serta kontribusi AKG tertinggi ialah 5% dan 3.

Kata kunci: *tortilla chips*, fortifikasi, nanokalsium, *Anodonta woodiana*.

## **1. DETOKSIFIKASI & FORTIFIKASI NANOKALSIMUM KERANG**

Kalsium merupakan salah satu mineral esensial yang memiliki peranan penting di dalam tubuh yaitu sebagai komponen utama pembentuk tulang dan gigi (Muchtadi *et al.* 1993). Konsumsi kalsium yang kurang akan menyebabkan tulang menjadi rapuh dan mudah patah atau disebut dengan penyakit osteoporosis. Pada usia lanjut, kalsium yang hilang dari tubuh lebih besar daripada kalsium yang diabsorpsi. Berdasarkan hasil analisis data risiko osteoporosis oleh Puslitbang Gizi Depkes bekerja sama dengan PT Fonterra Brands Indonesia tahun 2006 menyatakan 2 dari 5 orang Indonesia memiliki risiko osteoporosis. Hal ini juga didukung oleh *Indonesian White Paper* yang dikeluarkan Perhimpunan Osteoporosis Indonesia (Perosi) tahun 2007, osteoporosis pada wanita di atas 50 tahun mencapai 32,3%, sementara pada pria di atas 50 tahun mencapai 28,8% (Kemenkes 2009). Logam berat masuk melalui mekanisme transport pasif, transport aktif, maupun endositosis. Semakin tinggi konsentrasi logam berat di ekosistem perairan, bioakumulasi dalam tubuh kerang semakin tinggi, karena beberapa logam tidak dapat dimetabolisme oleh tubuhnya, dan beberapa lainnya berafinitas tinggi pada pembentukan jaringan yang kaya senyawa non-lipid (Gupta & Singh 2011). Kajian mengenai bioakumulasi logam berat pada kekerangan (*Bivalvia*) di daerah tropis merupakan kegiatan

biomonitoring yang sangat dianjurkan, agar pangkalan data tentang pencemaran logam berat dapat dipantau dengan mudah. Dibandingkan ikan dan krustasea, kekerangan memiliki aktivitas enzim sangat rendah untuk metabolisme terhadap *persistent organic pollutants* (POPs), seperti hidrokarbon aromatik dan bifenil poliklorin, sehingga konsentrasi pencemar di tubuh kerang lebih akurat merefleksikan magnifikasi pencemaran di lingkungan (Otchere 2003).

Kalsium yang umum dikonsumsi terdapat dalam bentuk mikro kalsium. Ukuran partikel kalsium ini terkait dengan besarnya penyerapan kalsium oleh tubuh. Ukuran mikro dapat terabsorpsi hanya 50% sehingga sering menyebabkan defisiensi. Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang lebih kecil perlu dikembangkan untuk memperbesar penyerapan kalsium dalam tubuh. Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang perlu dikembangkan adalah teknologi nano. Nano kalsium mempunyai ukuran yang sangat kecil yaitu  $10^{-9}$  m yang menyebabkan reseptor cepat masuk ke dalam tubuh dengan sempurna, oleh karena itu nano kalsium dapat terabsorpsi oleh tubuh hampir 100% (Suptijah 2009). Sumber kalsium yang umum dikonsumsi masyarakat adalah susu, padahal ada sumber kalsium lain yang belum dieksplorasi yaitu sumber kalsium dari hewan perairan. Salah satu hewan perairan sebagai sumber kalsium yang digunakan pada

penelitian ini adalah cangkang dari jenis kerang-kerangan, yaitu cangkang Kijing Taiwan (*A. woodiana*) yang merupakan salah satu komoditas perairan kerang air tawar yang digemari masyarakat. Umumnya masyarakat mengonsumsi Kijing Taiwan berupa dagingnya. Cangkang Kijing Taiwan banyak yang terbuang sehingga menghasilkan limbah padat yang cukup tinggi. Salah satu upaya untuk mengurangi limbah padat tersebut adalah mengolah limbah cangkang kijing dengan mengekstrak kandungan kalsiumnya yang dapat dimanfaatkan sebagai asupan kalsium tambahan ke dalam tubuh.

Cangkang kijing memiliki kandungan mineral berupa komponen kalsium yang tinggi sebagai penyusun dasar dari pelindung tubuhnya yang keras. Penelitian yang telah dilakukan Rohanah *et al.* (2009) menunjukkan bahwa kandungan kalsium yang terdapat pada cangkang kerang (*bivalvia*) adalah sebesar 39,38%. Penelitian Wardhani (2009) menunjukkan bahwa kandungan kalsium karbonat pada cangkang Kijing Taiwan ukuran < 90 mm sebesar 39,55%. Cangkang kijing mempunyai potensi sebagai penyedia nano kalsium yang dapat dimanfaatkan sebagai suplemen untuk meningkatkan kesehatan tubuh terutama tulang dan gigi.

## **2. PUSTAKA NANOKALSIUM CANGKANG *A. woodiana***

### **Deskripsi dan Klasifikasi Kijing Taiwan (*A. woodiana*)**

Kijing Taiwan merupakan jenis kerang yang hidup di kolam, danau atau perairan tawar lainnya. Kijing Taiwan mempunyai pola distribusi memencar dengan populasi berkelompok pada habitatnya. Faktor lingkungan yang mempengaruhi kehidupan kijing yaitu suhu, pH, oksigen, endapan lumpur dan fluktuasi permukaan air. Klasifikasi Kijing Taiwan (*A. woodiana*) menurut Pennak (1989) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Mollusca
Kelas	: Pelecypoda
Subkelas	: Lamellibranchia
Ordo	: Schizodonta
Famili	: Unionidae
Genus	: <i>Anodonta</i>
Spesies	: <i>Anodonta woodiana</i>

Tubuh kijing terletak di dalam cangkang yang terdiri atas: (1) massa viseral, terletak melekat di bagian dorsal dan terdapat alat tubuh; (2) kaki berotot merupakan bagian anteroventral massa viseral; (3) insang ganda, melekat dan terletak di kanan dan kiri kaki; (4) mantel terdiri atas dua bagian berupa selaput tipis yang melekat pada permukaan dalam cangkang. Bagian posterior memiliki sifon inkuren (ventral) dan ekskuren (dorsal). Otot aduktor anterior dan aduktor posterior yang berfungsi untuk menutup cangkang terletak pada bagian dorsal. Otot retraktor terletak di dekat masing-masing otot aduktor yang berfungsi untuk menarik kaki



ke dalam. Otot protaktor anterior yang berfungsi membantu menjulurkan kaki terletak di sebelah medial otot aduktor anterior (Sugiri 1989).

Tubuh pelecypoda pada dasarnya pipih secara lateral dan seluruh tubuh tertutup dua keping cangkang yang berhubungan di bagian dorsal dengan adanya *hinge ligament*, yaitu semacam pita elastik yang terdiri dari bahan organik seperti zat tanduk (*conchiolin*) sama dengan periostrakum, bersambungan dengan periostrakum cangkang. Periostrakum merupakan lapisan cangkang pelecypoda paling luar dan menutupi dua lapisan kapur atau lebih di bawahnya. Lapisan kapur tersebut terdiri dari aragonit atau campuran aragonit dan calcite yang tersusun sebagai bentuk prisma, bilah-bilah, atau lembaran-lembaran, bentuk lensa atau bentuk lain yang lebih kompleks (Suwignyo *et al.* 1998).

Cangkang Kijing Taiwan (*A. woodiana*) terdiri atas dua bagian yang sama besar dan terletak di sebelah lateral. Cangkang menyatu di bagian dorsal akibat adanya ligament sendi yang terdapat diantara dua cangkang tersebut. Cangkang bagian dorsal memiliki gigi sendi yang bekerja sebagai sendi dan umbo, yaitu bagian yang menonjol dan merupakan bagian yang tertua. Umbo memiliki garis-garis kosentris yang merupakan garis pertumbuhan (Sugiri 1989). Cangkang bivalva tersusun atas kalsium karbonat yang terbentuk dari lapisan *calcite* dan *aragonite* (John *et al.* 1972). Cangkang kijing terdiri

atas tiga lapisan yaitu (a) periostrakum, lapisan terluar yang tipis yang terdiri dari zat tanduk, berfungsi melindungi lapisan di bawahnya dari pelarutan oleh asam karbonat dalam air; (b) lapisan perismatik terdiri atas kristal kalsium karbonat; dan (c) lapisan mutiara, berupa lapis-lapis kalsium karbonat yang bersifat mengkilat. Kedua lapisan pertama dibentuk oleh tepi mantel sedangkan lapisan mutiara dibentuk oleh seluruh permukaan mutiara (Sugiri 1989).

### **Teknologi Nano**

Definisi nanoteknologi didasarkan pada kata awal "nano" dari bahasa Yunani yang berarti "kerdil". Dalam istilah yang lebih teknis, kata "nano" berarti  $10^{-9}$  atau sepermilyar. Nanoteknologi tidak selalu teknologi baru untuk desain, proses dan penggunaan material pada skala nanometer. Kata nanoteknologi umumnya digunakan ketika mengacu pada bahan-bahan dengan ukuran 1 sampai 100 nanometer (Greiner 2009). Teknologi nano adalah suatu desain, karakterisasi, produksi dan penerapan struktur, perangkat dan sistem dengan mengontrol bentuk dan ukuran pada skala nanometer (Park 2007).

Pertama kali konsep nanoteknologi diperkenalkan oleh Richard Feynman pada sebuah pidato ilmiah yang diselenggarakan oleh American Physical Society di California Institute of Technology tahun 1959 dengan judul "There's Plenty of Room at the Bottom". Richard Feynman adalah

seorang ahli fisika dan pada tahun 1965 memenangkan hadiah Nobel dalam bidang fisika. Istilah nanoteknologi pertama kali diresmikan oleh Prof. Norio Taniguchi dari Tokyo Science University tahun 1974 dalam makalahnya yang berjudul "On the Basic Concept of „Nano-Technology". Pada tahun 1980 definisi nanoteknologi dieksplorasi lebih jauh lagi oleh Dr. Eric Drexler melalui bukunya yang berjudul "Engines of Creation: The coming Era of Nanotechnology" (Toumey 2008).

Nanoteknologi didasarkan pada partikel yang ukurannya kurang dari 100 nanometer untuk membangun sifat dan perilaku baru dari struktur nano tersebut (Poole dan Owens 2003). Nanoteknologi meliputi penerapan ilmu pengetahuan dan rekayasa pada skala atom. Hal ini melibatkan konstruksi struktur kecil dan perangkat dengan memanipulasi masing-masing molekul dan atom yang memiliki sifat unik dan kuat. Struktur ini dapat digunakan dalam bidang kedokteran dan bioteknologi; energi dan lingkungan; dan telekomunikasi (Einsiedel 2005). Aplikasi nanoteknologi di sektor pangan meliputi peningkatan rasa, warna, flavor, tekstur dan konsistensi produk makanan, meningkatkan penyerapan serta bioavailabilitas nutrisi dan senyawa bioaktif (Greiner 2009). Pada bidang elektronik, teknologi nano diaplikasikan untuk membuat komputer yang lebih cepat dan *powerfull*, kamera digital, *cell phone*, *liquid crystal display (LCD)*, *light emitting dioda (LED)*. Pada industri otomotif, teknologi nano telah

digunakan untuk mengisi lubang-lubang yang sangat kecil secara lebih efektif sehingga mobil menjadi lebih mengkilat catnya (Chasanah 2007).

### **Pembuatan Nanopartikel**

Nanopartikel dapat diproduksi dengan berbagai metode, diantaranya sintesis plasma, *wet-phase processing*, presipitasi kimia, *sol-gel processing*, pengolahan mekanik, sintesis *mechanochemical*, *high-energy ball milling*, *chemical vapour deposition* dan ablasi laser (Park 2007). Beberapa metode untuk sintesis nanopartikel adalah *co-precipitation*, *ultrasound irradiation*, elektrokimia, dan sintesis hidrotermal (Kosa *et al.* 2009). Penelitian Sun *et al.* (2010) berhasil membuat nanopartikel kalsium menggunakan teknik *spray drying* dengan penggunaan *two-liquid nozzle*. Ada dua metode yang dapat digunakan dalam sintesis nanomaterial, yaitu secara *top down* dan *bottom up*. *Top down* merupakan pembuatan struktur nano dengan memperkecil material yang besar, sedangkan *bottom-up* merupakan cara merangkai atom atau molekul dan menggabungkannya melalui reaksi kimia untuk membentuk nano struktur (Greiner 2009). Contoh metode *top down* adalah penggerusan dengan alat *milling*, sedangkan teknologi *bottom up* yaitu menggunakan teknik sol-gel, presipitasi kimia, dan aglomerasi fasa gas (Dutta dan Hofmann 2005).

Teknologi *bottom up* dimulai dengan molekul dan bahan aktif yang dilarutkan dengan pelarut organik kemudian pelarut dihilangkan. Teknologi *top down* menggunakan berbagai jenis penggilingan dan teknik homogenisasi. Teknologi *top down* lebih populer dibandingkan teknologi *bottom up*. *Top down* dikenal sebagai "nanosizing", dalam kata lain *top down* adalah proses yang memecah kristal partikel besar menjadi potongan-potongan kecil (Gulsun *et al.* 2009). Metode presipitasi merupakan teknik pendekatan *bottom up*. Metode presipitasi dilakukan dengan cara zat aktif dilarutkan ke dalam pelarut, lalu ditambahkan larutan lain yang bukan pelarut (*anti-solvent*), hal ini menyebabkan larutan menjadi jenuh dan terjadi nukleasi yang cepat sehingga membentuk nanopartikel (Kent 2009). Kelebihan metode ini adalah sederhana dan biaya rendah (Gulsun *et al.* 2009). Kelemahan metode ini adalah nanopartikel yang terbentuk harus distabilisasi untuk mencegah timbulnya kristal berukuran mikro (Kent 2009).

Salah satu metode presipitasi yang pertama adalah teknologi pembuatan *hydrosol*. Teknologi ini dikembangkan oleh Sucker pada tahun 1988 dan merupakan hak cipta milik Sandoz (sekarang bernama Novartis). Teknologi ini sesungguhnya merupakan metode presipitasi klasik yang dikenal sebagai "*via humida paratum*". Pada metode ini, zat aktif dilarutkan ke dalam pelarut, lalu larutan tersebut

dimasukkan ke dalam larutan lain yang bukan pelarut zat aktif tersebut sehingga menghasilkan presipitasi zat aktif yang halus (Junghans dan Muller 2008). Menurut Haskell (2005), metode presipitasi dilakukan dengan mengendalikan kelarutan bahan di dalam larutan melalui perubahan pH, suhu, atau pelarut. Endapan yang dihasilkan dari kondisi sangat jenuh memiliki banyak partikel berukuran kecil. Kelebihan metode ini adalah dapat menghasilkan partikel lebih kecil dari 100 nm dan pemakaian energi sangat rendah.

### **Kalsium**

Kalsium merupakan salah satu mineral makro. Mineral makro adalah mineral yang dibutuhkan oleh tubuh dalam jumlah lebih dari 100 mg per hari. Kalsium merupakan mineral yang paling banyak terdapat di dalam tubuh, yaitu 1,5-2% dari seluruh berat tubuh orang dewasa atau kurang lebih sebanyak 1 kg. Pada jumlah tersebut, 99% berada di dalam jaringan keras, yaitu tulang dan gigi terutama dalam bentuk hidroksiapatit  $\{3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \text{Ca}(\text{OH})_2\}$ . Sisanya terdapat dalam cairan dan jaringan tubuh. Hidroksiapatit adalah kristal yang terdiri dari kalsium fosfat atau kombinasi kalsium fosfat dan kalsium hidroksida (Almatsier 2009). Kalsium dalam sel hidup membentuk ikatan kompleks dengan protein, karbohidrat, dan lemak. Ikatan kalsium bersifat selektif dan mampu berikatan dengan oksigen netral, termasuk grup alkohol dan karbonil (Fennema 1996).

Secara geologi kalsium dapat diperoleh dari beberapa jenis mineral, seperti Ca-feldspar (pelapukan silikat), kalsit/aragonit ( $\text{CaCO}_3$ ), dolomit ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ), gipsum ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dan anhidrid ( $\text{CaSO}_4$ ). Mineral-mineral karbonat dapat diperoleh dari batuan yang tersusun oleh mineral ini, seperti batu gamping, *chalk*, batu dolomit, dan batu napal. Batu gamping adalah suatu batuan sedimen yang mengandung lebih dari 50% mineral-mineral kalsit dan dolomit. *Chalk* adalah batuan karbonat berwarna putih yang berukuran halus, yang mengandung 97,5-98,5% kalsium karbonat. Batu dolomit atau sering disebut sebagai *dolostone* batuan karbonat yang secara dominan tersusun oleh dolomit (Warmada dan Titisari 2004). Menurut Scelfo dan Flegal (2000) kalsium yang digunakan dalam suplemen ada yang dari sumber alam dan ada yang disintesis. Kalsium dari sumber alam berupa hidroksiapatit atau kalsium fosfat ( $\text{CaPO}_4$ ), dolomit [ $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ], dan kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ). Kalsium yang disintesis terdapat dua jenis utama sumber kalsium yaitu garam kalsium dan kalsium terikat dengan organik yang membentuk kelat (*calcium bound with various organic chelates*). Produk lainnya yang disintesis adalah kalsium fosfat, kalsium sulfat, dan kalsium klorida. Nano kalsium merupakan mineral predigestif yang sangat efisien dalam memasuki sel tubuh karena ukurannya yang super kecil (nanometer) sehingga dapat diabsorpsi dengan cepat dan sempurna (Suptijah 2009). Gao *et al.* (2007) menyatakan

bahwa tikus yang diberi nanokalsium memiliki buangan kalsium yang rendah pada feses dan urin dibandingkan tikus yang diberi pakan mikrokalsium.

### **Kegunaan Kalsium dalam Tubuh**

Kalsium merupakan mineral esensial yang ditemukan dalam jumlah yang besar di dalam tubuh. Sembilan puluh sembilan persen dari semua kalsium dalam tubuh ditemukan dalam tulang dan gigi. Satu persen sisanya dalam darah. Kalsium memegang peranan penting dalam konduksi saraf, kontraksi otot, dan pembekuan darah. Jika tingkat kalsium dalam tetapan darah di bawah normal, kalsium akan diambil dari tulang dan dimasukkan ke dalam darah untuk mempertahankan tingkat kalsium darah, oleh karena itu, penting untuk mengkonsumsi kalsium yang cukup untuk menjaga darah yang memadai dan tingkat kalsium tulang (Houtkooper dan Farrell 2011).

Kalsium juga berfungsi sebagai katalisator berbagai reaksi biologis, seperti absorpsi vitamin B12, tindakan enzim pemecah lemak, lipase pankreas, ekskresi insulin oleh pancreas, pembentukan dan pemecahan asetilkolin, yaitu bahan yang diperlukan dalam transmisi suatu rangsangan dari serabut syaraf yang satu ke yang lainnya. Kalsium yang diperlukan untuk mengkatalisis reaksi-reaksi ini diambil dari persediaan kalsium dalam tubuh (Almatsier 2009).



### **Transportasi dan Penyerapan Kalsium**

Tulang merupakan suatu jaringan dinamis yang melakukan pembentukan dan pembongkaran setiap saat melalui suatu proses yang disebut dengan "remodelling tulang" (Ganong 1995). Absorpsi kalsium dari saluran pencernaan akan efisien bila kalsium dalam bentuk yang terlarut, umumnya dalam bentuk ion kalsium (Linder 1992). Salah satu faktor pendorong dari daya larut mineral yang dapat memecah dan mereduksi molekul-molekul mineral menjadi bentuk yang mudah diserap oleh tubuh adalah kondisi pH asam (Sediaoetama 1993). Kondisi asam menyebabkan kalsium yang asalnya berikatan dengan komponen lain berubah menjadi bentuk sederhana (ion) sehingga akan meningkatkan kelarutannya, dalam hal ini asam lambung bertindak sebagai *enhancer* yaitu molekul atau senyawa yang mempengaruhi kalsium sehingga bersifat larut dan selanjutnya dapat diabsorpsi oleh mukosa sel usus (Suzuki *et al.* 1992).

Menurut Bronner (2008) absorpsi kalsium pada usus halus melibatkan dua proses, yaitu transeluler dan paraseluler. Jalur transeluler terjadi pada proksimal intestinal terutama pada duodenum, sedangkan jalur paraseluler terjadi di sepanjang usus kecil terutama pada ileum dan jejunum. Bronner (1992) menyatakan bahwa jalur transeluler terdiri dari tiga jalur, yaitu (1) masuk ke "brush border membrane" yang terdapat pada enterosit (sel epitel usus halus), (2) difusi

intraseluler, dan (3) ekstrusi pada membran basolateral/penekanan kalsium keluar membran basolateral menuju cairan ekstraseluler yang dilakukan dengan pompa ATPase. Transport kalsium dengan jalur paraseluler yaitu melalui *tight junction* yang ada di antara sel epitel. Mineral tulang berfungsi sebagai reservoir utama untuk sirkulasi kalsium pada cairan ekstraseluler. Kalsium memasuki cairan ekstraseluler dari saluran pencernaan dengan absorpsi dan dari tulang dengan resorpsi. Kalsium meninggalkan cairan ekstraseluler melalui saluran pencernaan, ginjal dan kulit, serta masuk ke dalam tulang melalui formasi tulang (pembentukan tulang) (WHO 1998).

### **Kebutuhan Kalsium**

Kebutuhan kalsium dalam tubuh manusia berbeda menurut usia dan jenis kelamin. *Recommended Daily Allowance* (RDA) merekomendasikan konsumsi kalsium sebesar 800 mg untuk umur 1-10 tahun dan 25 tahun ke atas. Umur 11-24 tahun dan untuk wanita hamil atau menyusui direkomendasikan konsumsi kalsium sebanyak 1.200 mg (Percival 1999).

### **Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah memanfaatkan limbah cangkang Kijing Taiwan sebagai sumber nano kalsium, adapun tujuan khususnya adalah:

1. Menentukan rendemen kalsium yang dihasilkan.

2. Menentukan karakteristik nano kalsium yang dihasilkan, meliputi morfologi, derajat putih, komponen mineral, dan *particle size*.

### **Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Masyarakat kita memerlukan suatu substansi penting yaitu suplemen mineral yang dapat melindungi tubuh dari racun logam berat merkuri khususnya bagi anak autisme. Salah satu suplemen mineral adalah Ca, Mg dan Zn yang banyak terkandung dalam serbuk nano kalsium dari Kijing Taiwan.
2. Pembuatan serbuk nano kalsium untuk pembuatan suplemen dalam bentuk granul instan dan fortifikan *tortila chips* diharapkan akan menghasilkan produk suplemen mineral sebagai pendetoksifikasi racun logam berat Hg dan *tortilla chips* yang terbaik sebagai *snack* berkalsium tinggi, serta lebih mudah dikonsumsi karena lebih tahan lama, mudah disimpan sesuai tuntutan kehidupan modern yang serba praktis.

### **3. METODE NANOKALSIUM CANGKANG A. *woodiana***

#### **Waktu dan Tempat**

Penelitian ini telah dilaksanakan selama empat bulan. Preparasi bahan baku dilakukan di Laboratorium Biologi FMIPA

Universitas Pakuan dan Laboratorium Preservasi dan Pengolahan Hasil Perairan, Departemen Teknologi Hasil Perairan. Uji proksimat, uji derajat putih dilakukan di Laboratorium Farmasi FMIPA Universitas Pakuan. Uji *atomic absorption spectrophotometry* (AAS) dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA Universitas Pakuan. Uji *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan di Laboratorium Geologi Kuarter, Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi Kelautan (P3GL), Bandung.

### **Bahan dan Alat**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu cangkang Kijing Taiwan (*A. woodiana*), larutan asam klorida (HCl) 1 N, NaOH 3 N, dan akuades. Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain alat gelas, tanur, toples, termometer, oven, *hotplate*, kertas saring, kertas pH dan timbangan serta alat analisis proksimat, AAS Shimadzu AA-7000 dan SEM JSM-35C.

Tahapan penelitian meliputi preparasi sampel cangkang kijing, uji proksimat cangkang kijing, serta pembuatan serbuk nano kalsium dengan perlakuan lama ekstraksi terhadap rendemen dan kadar mineral yang meliputi kalsium, fosfor, kalium, natrium, mangan, besi, dan zinc. Tahap selanjutnya yaitu analisis fisik dan mikroskopis serbuk nano

kalsium meliputi analisis derajat putih, analisis ukuran partikel, analisis kadar mineral.

**Preparasi cangkang Kijing Taiwan (*A. woodiana*)**

Preparasi cangkang kijing dilakukan dengan pencucian cangkang. Cangkang kemudian dikeringkan dengan panas matahari. Cangkang yang telah kering selanjutnya dilakukan penghancuran dengan alat *hammer mill* ukuran 60 *mesh* sehingga menjadi tepung cangkang. Tepung cangkang selanjutnya diuji proksimat untuk mengetahui komposisi kimianya. Kegiatan pembuatan tepung cangkang dapat dilihat pada Gambar 8.



**Kijing Taiwan (*A. woodiana*) dan pencucian kijing**



Pengukuran panjang kijing dan penimbangan berat kijing



Pemisahan daging kijing dan pembersihan cangkang



Penjemuran cangkang dan penghancuran cangkang



Perebusan dengan NaOH 1N dan pencucian sampai netral



Penirisan hingga kering dan pengeringan dengan oven



Pengayakan tepung dan tepung cangkang kijing

Gambar 8. Pembuatan tepung cangkang kijing



### Pembuatan serbuk nano kalsium

Tepung cangkang selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan pelarut HCl pada suhu 90 0C dengan perlakuan waktu ekstraksi selama 1; 1,5; dan 2 jam. Hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan penyaringan dengan kertas saring sehingga diperoleh cairan/filtrat. Filtrat yang diperoleh dilakukan presipitasi dengan penambahan NaOH 3 N dan dilakukan pengadukan serta didiamkan sampai presipitasi tidak terbentuk lagi. Endapan yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan cara dekantasi. Endapan tersebut selanjutnya dilakukan proses netralisasi menggunakan akuades sampai pH 7. Tahap selanjutnya adalah tahap pengeringan endapan dengan oven dan diteruskan dengan pembakaran dalam tanur pada suhu 600 0C sehingga terbentuk serbuk kalsium. Serbuk tersebut selanjutnya dilakukan analisis fisika dan mikroskopis. Diagram alir pembuatan serbuk nano kalsium dapat dilihat pada Gambar 9.





Tepung cangkang kijing dan ekstraksi dengan HCl



Pemanasan suhu  $90^{\circ}\text{C}$  dan presipitasi NaOH 3 N



Endapan kalsium dan netralisasi dengan akuades



Proses Dekantasi dan filtrasi



Penyaringan filtrat dan pemvakuman



Hasil Pemvakuman dan pengeringan dengan oven



Pembakaran di atas *hot plate* dan hasil pembakaran



Pengabuan dalam tanur dan serbuk nano kalsium

Gambar 9. Pembuatan nano kalsium cangkang kijing

Analisis kimia, fisika dan mikroskopis

Cangkang kijing yang telah dihancurkan dengan *hammer mill* menjadi tepung cangkang dilakukan analisis kimia yaitu analisis proksimat, sedangkan serbuk nano kalsium yang telah dihasilkan dilakukan analisis fisika yaitu analisis mineral menggunakan AAS, perhitungan rendemen, dan uji derajat putih, serta analisis mikroskopis berupa pengukuran partikel dengan menggunakan SEM.

Analisis kimia

a) Kadar air (AOAC 1980)

Cawan porselen dikeringkan dalam oven pada suhu 105 oC selama 1 jam dan didinginkan dalam desikator  $\pm 15$  menit kemudian ditimbang. Sebanyak 1 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan kemudian dikeringkan dalam oven dengan suhu 105 oC selama 8 jam, kemudian dimasukkan ke dalam desikator sampai dingin dan ditimbang, selanjutnya sampel kadar air dihitung.

b) Kadar abu (AOAC 1980)

Sebanyak 1 gram sampel ditempatkan dalam cawan porselen kemudian dibakar sampai tidak berasap, kemudian diabukan dalam tanur pada suhu 600 oC selama 2 jam, selanjutnya ditimbang.

c) Kadar lemak (AOAC 1980)

Sebanyak 2 gram sampel disebar diatas kapas yang beralas kertas saring dan di gulung membentuk *thimble*,

kemudian dimasukkan ke dalam labu soxhlet. Sampel diekstraksi selama 6 jam dengan pelarut lemak berupa heksan sebanyak 150 ml. Lemak yang terekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 100 oC selama 1 jam.

d) Kadar protein (AOAC 1980)

Sebanyak 0,25 gram sampel dimasukkan ke dalam labu kjeldahl 100 ml dan ditambahkan selenium 0,25 gram dan 3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Sampel selanjutnya dilakukan destruksi (pemanasan dalam keadaan mendidih) selama 1 jam, sampai larutan jernih. Sampel kemudian ditambahkan 50 ml aquades dan 20 ml NaOH 40%, selanjutnya didestilasi. Hasil destilasi ditampung dalam labu erlenmeyer yang berisi campuran 10 ml H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2% dan 2 tetes indikator *Brom Cresol Green-Methyl Red* berwarna merah muda. Setelah volume hasil tampungan (destilat) menjadi 10 ml dan berwarna hijau kebiruan, destilasi dihentikan dan destilat dititrasi dengan HCl 0,1 N sampai berwarna merah muda. Perlakuan yang sama dilakukan juga terhadap blanko.

Analisis fisika

a) Rendemen serbuk nanokalsium

Rendemen merupakan persentase dari perbandingan bobot serbuk kalsium yang dihasilkan terhadap bobot cangkang kijing sebelum mengalami perlakuan.

b) Analisis kadar mineral (Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Mn) dan logam berat Pb (Reitz *et al.* 1987)

Analisis kadar mineral dilakukan untuk mengetahui kadar mineral pada serbuk nano kalsium. Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar mineral yang meliputi kalsium, magnesium, kalium, mangan, natrium, besi, dan seng. Analisis kadar mineral dilakukan menggunakan metode AAS.

c) Analisis fosfor (Tausky dan Shorr 1953)

Preparasi larutan dilakukan terlebih dahulu yaitu dengan membuat larutan A dan larutan B. Pada larutan A, sebanyak 10 g ammonium molibdat 10% ditambah dengan 60 ml akuades, selanjutnya ditambahkan 28 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dan dilarutkan dengan akuades hingga 100 ml. Tahap selanjutnya adalah membuat larutan B, sebanyak 10 ml larutan A ditambah dengan 60 ml akuades dan 5 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 100 ml. Sampel hasil pengabuan basah dimasukkan ke dalam tabung kuvet kemudian ditambah dengan 2 ml larutan B. Intensitas warna diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 660 nm.

d) Derajat putih serbuk nanokalsium (Faridah *et al.* 2006)

Pengukuran derajat putih serbuk nanokalsium dilakukan dengan menggunakan alat Kett Digital *Whiteness-meter* model C-100s. Warna hitam menunjukkan nilai 0, sedangkan nilai 100 menunjukkan derajat putih yang setara dengan pembakaran pita magnesium. Pengukuran derajat putih dilakukan dengan cara meletakkan serbuk dalam wadah

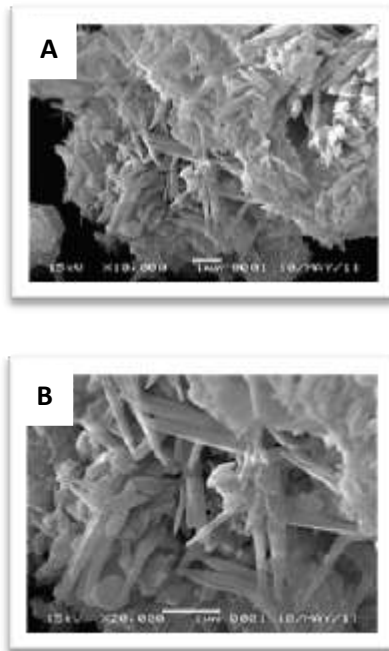


tertentu, kemudian hasil pengukuran derajat putih terlihat pada monitor alat tersebut.

Analisis mikroskopis

a. Analisis *partikel size* dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (Toya *et al.* 1986)

Sampel ditaburkan pada *specimen holder* yang dilapisi *double sticky tape*, kemudian dibersihkan dengan *hand blower* untuk menghilangkan debu-debu pengotor. Sampel yang telah menempel pada *double sticky tape* kemudian dilapisi emas-pladium setebal  $400 \text{ \AA}$  dengan menggunakan mesin ion Sputter JFC-1100. Coating tersebut dimaksudkan agar benda uji yang akan dilakukan pemotretan menjadi penghantar listrik. Sampel yang telah dilapisi emas-pladium selanjutnya dimasukkan ke dalam *specimen chamber* pada mesin SEM untuk dilakukan pemotretan pada perbesaran 10.000x, dan 20.000x. Sumber elektron dipancarkan menuju sampel untuk memindai permukaan sampel, kemudian emas sebagai konduktor akan memantulkan elektron ke detektor pada mikroskop SEM. Hasil pemindaian akan diteruskan ke detector menuju monitor. Hasil yang diperoleh berupa gambar tiga dimensi permukaan serbuk nanokalsium (Gambar 10).



Gambar 10. Ukuran partikel serbuk nanokalsium (A) 10.000x, dan (B) 20.000x

#### Pembuatan Granul Instan

Sejumlah bahan pembuatan granul seperti serbuk nano Ca, stevia, laktosa, PVP ditimbang, lalu diayak menggunakan ayakan mesh 30 (Formulasi tertera pada Tabel 1). Serbuk nano Ca, laktosa, stevia dimasukkan ke dalam wadah baskom lalu diaduk hingga homogen kira-kira 5 menit. Ditambahkan PVP yang telah dicairkan dan dibiarkan

semalaman kemudian diaduk hingga terbentuk massa yang kompak.

**Tabel 1. Formulasi Granul instan**

Bahan	Formula
Nano kalsium	200 mg
Stevia	1%
PVP	3%
Laktosa	*
<b>Total</b>	<b>10 g</b>

\*Laktosa ditambahkan agar berat granul 10 g

Massa yang basah kemudian diayak menggunakan ayakan mesh 16 hingga terbentuk granul yang basah. Lalu granul dikeringkan didalam lemari pengering yang telah dialasi kain batis pada suhu 40-50<sup>0</sup>C semalaman hingga terbentuk granul kering. Granul kering diayak menggunakan ayakan mesh 20. Pada pembuatan granul kosong (plasebo) untuk serbuk nano Ca digantikan dengan laktosa dalam jumlah yang sama dan cara yang sama. Pembuatan granul instan dari nano kalsium cangkang Kijing Taiwan dapat dilihat pada Gambar 11.



Penimbangan bahan dan pengayakan bahan 30 mesh



Pencampuran bahan dan laktosa dan PVP



Pembuatan Mucilago PVP



Pencampuran mucilago ke dalam bahan



Penambahan laktosa Pengeringan dalam oven



Granul instan nano kalsium cangkang kijing

Gambar 11. Pembuatan granul instan nanokalsium kijing

### **Evaluasi Granul Instan**

Evaluasi granul instan meliputi: uji aliran granul, uji sudut istirahat, uji kompresibilitas, uji kadar air dan uji kelarutan, dan uji kandungan mineral. Formula granul instan adalah sebagai berikut:

Nano Ca	200 mg
Stevia	1%
PVP	3%
Laktosa	Add 10 g

Bahan dibuat sebanyak 150 g dan dibuat placebo tanpa penambahan nano Ca. Cara kerjanya meliputi: mengayak laktosa, stevia dengan mesh 30 dan menimbang semua bahan yang telah diayak. Selanjutnya melarutkan PVP dengan air panas dan didiamkan selama satu malam. Setelah itu mencampur semua bahan ( nano Ca, stevia dan laktosa) dalam plastik. Kemudian dimasukkan ke dalam baskom dan dicampurkan PVP yang telah didiamkan semalam. Selanjutnya diaduk hingga homogen dan dibasahi dengan air sekitar 10-12 ml sehingga massa granul mudah dikepal dan tidak hancur. Massa yang basah diayak dengan ayakan mesh 16. Pengeringan dalam oven dengan dilapisi kain batis pada suhu 45°C semalam.

Acuan untuk pengolahan data adalah sebagai berikut:

1. Kadar air granul maksimal 5%
2. Tipe aliran berdasarkan daya aliran

Nilai daya alir (g/detik)	Keterangan
>10	Bebas Mengalir
4-10	Mudah mengalir
1,6-4	Kohesif
<1,6	Sangat kohesif

3. Tipe aliran berdasarkan sudut diam

Sudut diam	Tipe aliran
<25 <sup>o</sup>	Sangat baik
25 <sup>o</sup> - 30 <sup>o</sup>	Baik
30 <sup>o</sup> - 40 <sup>o</sup>	Kurang baik
>40 <sup>o</sup>	Buruk

4. Indeks kompresibilitas (%)

Indeks kompresibilitas (5)	Tipe aliran
5-12	Sangat baik sekali
12-16	Sangat Baik
18-21	Baik
23-28	Sedang
28-35	Buruk
35-38	Sangat Buruk
>40	Sangat Buruk sekali

#### 4. HASIL NANOKALSIMUM CANGKANG *A. woodiana*

Tahapan penelitian pada tahun ketiga, meliputi analisis mineral granul instan dan uji detoksifikasi merkuri pada tikus percobaan.



### I. Analisis mineral (Ca, Mg, Fe, Zn, Na, K, P) granul instan

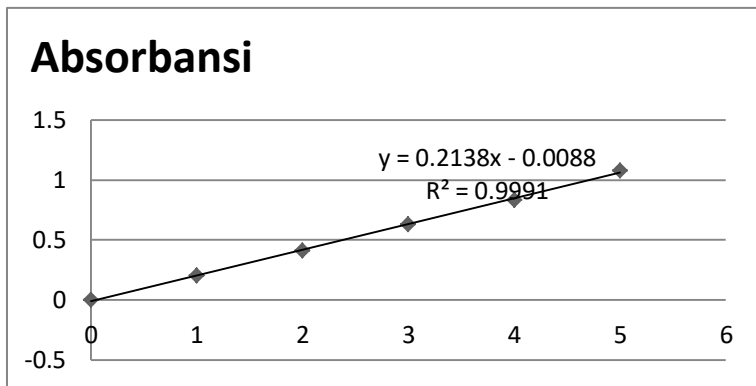
Analisis mineral granul Instan dengan menggunakan AAS, flamefotometer dan spektrofotometer.

Hasil Analisis Fe Granul Instan Nanokalsium

#### A. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Fe dengan AAS

No	Konsentrasi Fe (ppm)	Absorbansi
1	0	0,0008
2	1	0,2035
3	2	0,4124
4	3	0,6287
5	4	0,8312

Grafik Konsentrasi Fe (ppm) terhadap Absorbansi



Kadar Fe Granul instan Nanokalsium

Bobot contoh = 1,000 g

Faktor pengenceran 10x

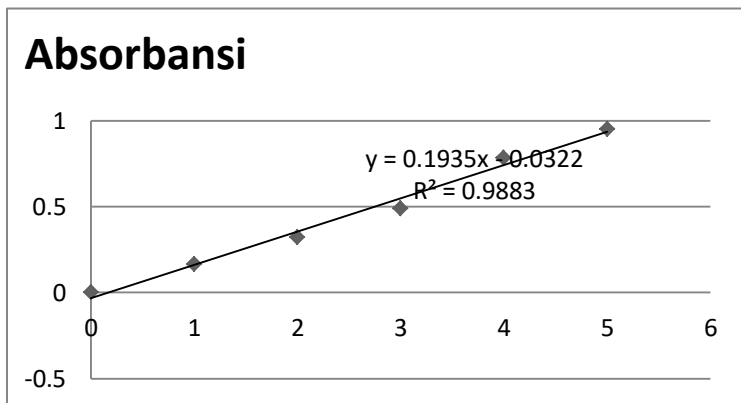
Absorbansi contoh I = 0,5869  
Absorbansi contoh II = 0,7425  
Kadar Fe granul instan = 31,6 ppm

Hasil Analisis K Granul Instan Nanokalsium

A. Kurva Kalibrasi Larutan Standar K dengan AAS

No	Konsentrasi K (ppm)	Absorbansi
1	0	0,0001
2	1	0,16546
3	2	0,32072
4	3	0,48863
5	4	0,7841

Grafik Konsentrasi K (ppm) terhadap Absorbansi



Kadar K Granul instan Nanokalsium

Bobot contoh = 1,000 g

Faktor pengenceran 500x

Absorbansi contoh I = 0,22450

Absorbansi contoh II = 0,21488

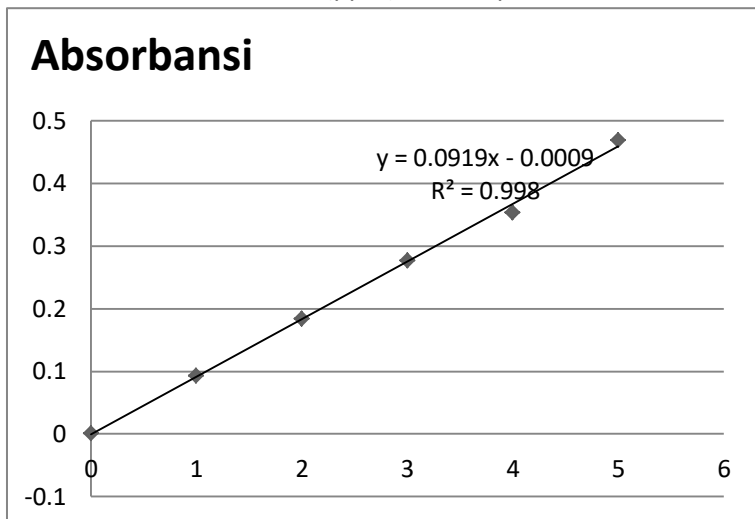
Kadar K granul instan = 685 ppm

Hasil Analisis Na Granul Instan Nanokalsium

A. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Na dengan AAS

No	Konsentrasi Na (ppm)	Absorbansi
1	0	0,00001
2	1	0,092458
3	2	0,18337
4	3	0,275801
5	4	0,352993

Grafik Konsentrasi Na (ppm) terhadap Absorbansi



Kadar Na Granul instan Nanokalsium

Bobot contoh = 1,000 g

Faktor pengenceran 100x

Absorbansi contoh I = 0,481693

Absorbansi contoh II = 0,463887

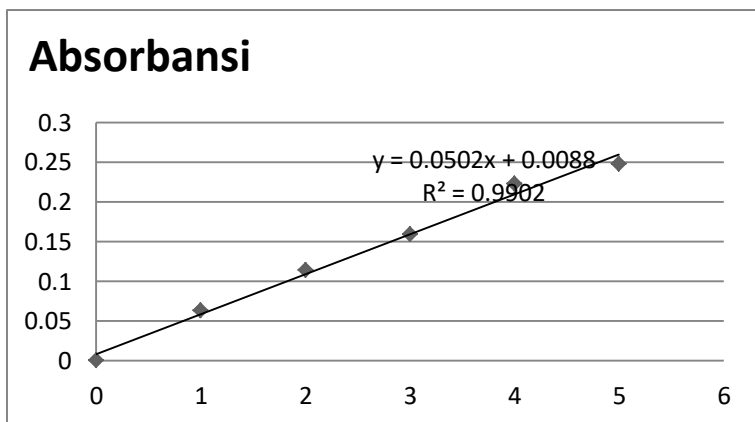
Kadar Fe granul instan = 504 ppm

Hasil Analisis Zn Granul Instan Nanokalsium

A. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Zn dengan AAS

No	Konsentrasi Zn (ppm)	Absorbansi
1	0	0
2	1	0,0634
3	2	0,11417
4	3	0,15893
5	4	0,2223

Grafik Konsentrasi Zn (ppm) terhadap Absorbansi



Kadar Zn Granul instan Nanokalsium

Bobot contoh = 1,000 g

Faktor pengenceran 10x

Absorbansi contoh I = 0,2559

Absorbansi contoh II = 0,2230

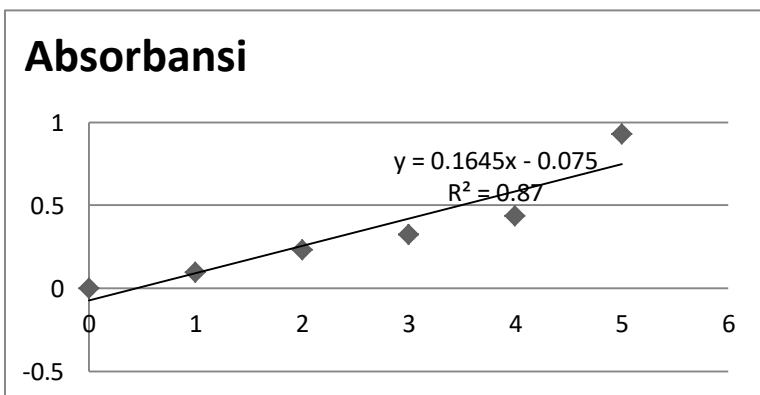
Kadar Zn granul instan = 3,4 ppm

Hasil Analisis P Granul Instan Nanokalsium

A. Kurva Kalibrasi Larutan Standar P dengan Spektrofotometer

No	Konsentrasi P (ppm)	Absorbansi
1	0	0,0005
2	1	0,0973
3	2	0,2302
4	3	0,3245
5	4	0,4347

Grafik Konsentrasi P (ppm) terhadap Absorbansi



Kadar P Granul instan Nanokalsium

Bobot contoh = 2,000 g

Absorbansi contoh I = 0,0056

Absorbansi contoh II = 0,0053

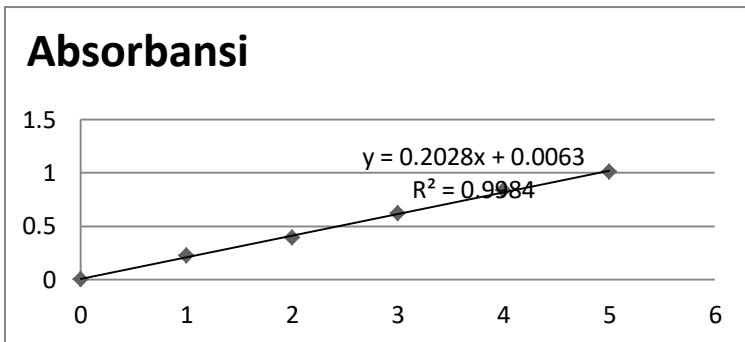
Kadar P granul instan = 0,02 g/100g

Hasil Analisis Mg Granul Instan Nanokalsium

A. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Mg dengan AAS

No	Konsentrasi Mg (ppm)	Absorbansi
1	0	0,0011
2	1	0,2242
3	2	0,3908
4	3	0,621
5	4	0,8342

Grafik Konsentrasi Mg (ppm) terhadap Absorbansi



Kadar Mg Granul instan Nanokalsium

Bobot contoh = 2,000 g

Absorbansi contoh I = 0,0076

Absorbansi contoh II = 0,0082

Kadar Mg granul instan = 0,34 g/100g

Hasil Analisis Mineral Granul Instan Nano kalsium Kijing Taiwan tercantum dalam Tabel 2. sebagai berikut:

Tabel 2. Hasil Analisis Mineral Granul Instan Nano kalsium Kijing Taiwan

No.	Mine ral	Absorbansi		Pengen ceran	Konsen trasi	Konsen trasi akhir
		I	II			
1	Fe	0,5869	0,7425	10x	3,16 ppm	31,6 ppm
2	K	0,22450	0,21488	500x	1,37 ppm	685 ppm
3	Na	0,481693	0,46388 7	100x	5,04 ppm	504 ppm
4	Zn	0,2559	0,2230	10x	0,34 ppm	3,4 ppm
5	P	0,0056	0,0053	-	0,02 %	0,02%
6	Mg	0,0076	0,0082	-	0,34%	0,34%

## **II. Uji Detoksifikasi Merkuri pada Tikus Percobaan**

Pengujian penurunan kadar racun logam Hg pada hati tikus putih secara histopatologis.

Tahapan pengujian :

### **Aklimatisasi dan Prosedur Pemberian Pakan Ditambah dengan Granul Instan Pada Tikus Percobaan**

Sebanyak limapuluh ekor tikus putih *rattus norvegicus* umur 15 minggu dengan berat 180 – 220 gram diaklimatisasi di laboratorium selama 7 hari. Hal ini diharapkan terjadi penyesuaian hewan coba terhadap kondisi lingkungan yang ada sehingga tidak terjadi kematian. Tikus dipelihara dalam ruangan yang berventilasi cukup, dikandangkan secara individual. Suhu ruangan berkisar 28 – 32 °C, dengan kelembaban 56 ± 5%. Makanan dan minuman diberikan dalam bentuk pelet tikus, setiap 2 hari dilakukan pembersihan kandang. Selama penelitian dilakukan tikus tidak ada yang mati. Untuk mengantisipasi bila ada yang mati maka tiap-tiap kelompok perlakuan jumlah sampel ditambah kurang lebih 10%. Bobot badan tikus ditimbang selama pemeliharaan untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangan tikus (Tabel 3).



*Detoksifikasi & Fortifikasi Nanokalsium Kerang*

<b>Tabel 3. Data bobot badan tikus</b>					
<b>Kelompok</b>	<b>No</b>	<b>Bobot Badan</b>			
		I	II	19/11/2013	22/11/2013
K. A	1	169	144	169	144
	2	177	154	177	154
	3	161	150	161	150
K. B	1	197	200	197	200
	2	153	154	153	154
	3	177	182	177	182
K. C	1	194	198	194	198
	2	177	191	177	191
	3	175	161	175	161
K. D	1	188	204	188	204
	2	170	191	170	191
	3	160	161	160	161
K. E	1	164	170	164	170
	2	169	153	169	153

Lanjutan Tabel 3. *Detoksifikasi & Fortifikasi Nanokalsium Kerang*

	3	163	161	163	161
K. F	1	172	169	172	169
	2	177	180	177	180
	3	177	179	177	179
K. A'	1	166	196	166	196
	2	157	178	157	178
	3	166	189	166	189
K. B'	1	162	153	162	153
	2	173		173	
	3	153	120	153	120
K. C'	1	161	165	161	165
	2	174	179	174	179
	3	167	179	167	179
K. D'	1	161	169	161	169
	2	168	165	168	165
	3	155	153	155	153
K. E'	1	161	159	161	159

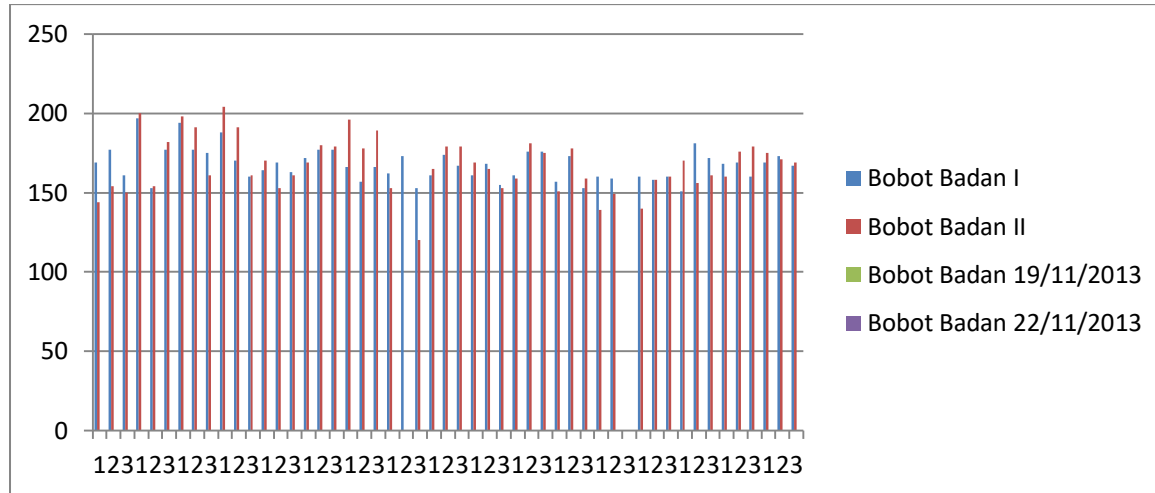
Lanjutan Tabel 3. *Detoksifikasi & Fortifikasi Nanokalsium Kerang*

	2	176	181	176	181
	3	176	175	176	175
K. F'	1	157	151	157	151
	2	173	178	173	178
	3	153	159	153	159
K. G'	1	160	139	160	139
	2	159	149	159	149
	3				
K. H'	1	160	140	160	140
	2	158	158	158	158
	3	160	160	160	160
K. I'	1	151	170	151	170
	2	181	156	181	156
	3	172	161	172	161
K. J'	1	168	160	168	160
	2	169	176	169	176
	3	160	179	160	179
K. K'	1	169	175	169	175

Lanjutan Tabel 3. *Detoksifikasi & Fortifikasi Nanokalsium Kerang*

	2	173	171	173	171
	3	167	169	167	169

Rekapitulasi Bobot Badan Tikus



Berdasarkan data bobot badan tikus maka dapat dilihat bahwa pakan standard dan minuman yang diberikan kepada tikus mendukung pertumbuhan dan perkembangannya, hal ini tampak dalam peningkatan bobot tubuh tikus.

Pakan standar yang diberi kepada tikus memenuhi kecukupan gizi bagi pertumbuhan dan perkembangan tikus. Data proksimat pakan tikus dapat dilihat pada Tabel 4.

<b>Tabel 4. Data Proksimat Pakan Tikus</b>		
<b>No</b>	<b>Komposisi</b>	<b>Jumlah</b>
1	Kadar Air	Max 13.0 %
2	Protein	19.0 - 21 %
3	Lemak	Min 5.0 %
4	Serat Kasar	Max 5.0 %
5	Abu	Max 7.0 %
6	Calcium	Min 0.9 %
7	Phospor	Min 0.6 %
8	Metabolic Energy	3000 - 3100 Kcal/Kg

### **Rancangan Penelitian dan Perlakuan**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), tikus percobaan diberi tiga perlakuan dan control dengan tiga ulangan (Steel RGD, Torrie JH. 1993). Selama tujuh hari, limapuluh ekor tikus diaklimatisasi terlebih dahulu. Pakan yang diberikan dalam bentuk pellet. Pemeliharaan Tikus

dengan Pakan Standar dan Minuman dilakukan di laboratorium (Gambar 12).

### **Pembuatan Suspensi Nano Ca**

Pembuatan Suspensi Nano Ca meliputi pembuatan larutan Natrium CMC 1 % dan pembuatan Irutan uji (Gambar 3). Tahapannya adalah sebagai berikut:

#### **Pembuatan Larutan Natrium CMC 1 %**

Ke dalam 50 ml air panas (70 °C) dimasukkan natrium CMC sebanyak 1 g sedikit demi sedikit, diaduk dengan menggunakan pengaduk elektrik hingga terbentuk larutan koloidal yang homogen. Volume dicukupkan dengan air suling hingga 100 ml dalam labu ukur 100 ml.



Gambar 12. Pemeliharaan Tikus dengan Pakan Standar dan Minuman

### **Pembuatan Larutan Uji**

Nano Ca sebanyak 9 mg, 13,5 mg atau 18 mg kemudian dimasukkan ke dalam lumpang dan digerus sambil ditambahkan sedikit demi sedikit suspensi natrium CMC 1% sebanyak 20 ml hingga homogen.

Sebagian pakan dan sebagian selain dicampur dengan granul instan dengan konsentrasi masing-masing A, B, C mg/ekor/hari. Duapuluh empat ekor tikus dibagi dalam 4 kelompok sehingga masing-masing kelompok terdapat 6 ekor tikus. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol diberi pakan standar selama 21 hari.

Pembuatan suspense nano Ca dimulai dari penimbangan nano Ca dan pengukuran CMC dapat dilihat pada tahapan sebagai berikut (Gambar 13.) :









Gambar 13. Pembuatan Tiga Dosis Suspensi Nano Ca

Kelompok II sebagai kelompok perlakuan I diberi pakan standar yang telah dicampur dengan granul instan dengan konsentrasi 9 mg/bobot badan tikus/hari selama 21 hari. Kelompok III sebagai kelompok perlakuan II diberi pakan standar yang telah dicampur dengan granul instan dengan konsentrasi 13,5 mg/ekor/hari selama 21 hari. Kelompok IV sebagai kelompok perlakuan III diberi pakan standar yang telah dicampur dengan granul instan dengan konsentrasi 18 mg/ekor/hari selama 21 hari. Konversi dosis manusia dan tikus adalah 0,018.

Bila suspensi nano Ca dicampur ke dalam pakan standar maka dikhawatirkan pakan tersebut tidak dimakan seluruhnya oleh tikus. Pemberian suspensi nano Ca kepada tikus dengan pencekakan menggunakan sendo lambung (Gambar 14). yang dilakukan secara hati-hari, agar suspensi nano Ca masuk ke dalam kerongkongan dan ke dalam lambung tikus. Tujuan pencekakan ini adalah agar perlakuan berhasil karena suspensi nano Ca dicerna seluruhnya oleh pencernaan tikus (Gambar 15).



Gambar 14. Sendo Lambung, Alat PENCEKAKAN Nano Ca kepada Tikus

Selanjutnya akan dilakukan prosedur pembedahan hewan uji dan pemeriksaan histopatologishati tikus, analisis logam Hg plasma heparin tikus setelah 48 jam pemberian Hg dengan AAS dan analisis data.



Gambar 15. Pencekukan Nano Ca kepada Tikus

Selanjutnya akan dilakukan prosedur pembedahan hewan uji dan pemeriksaan histopatologis tikus, analisis logam Hg plasma dan serum tikus setelah 48 jam pemberian Hg dengan AAS dan analisis data.

### **Induksi Hg asetat terhadap Tikus Percobaan**

Setelah pencekukan nano Ca selama 21 hari terhadap tikus percobaan, selanjutnya dilakukan induksi Hg asetat dengan dosis 1300  $\mu\text{g}/200\text{g}$  bobot badan tikus secara intraperitoneal, satu jam setelah pemberian nano Ca (Gambar 16).



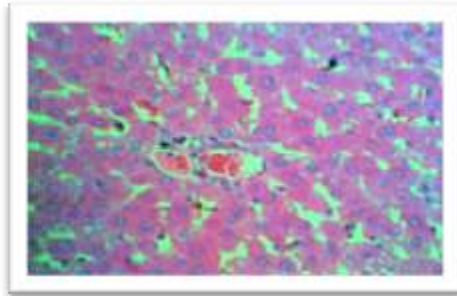
Gambar 16. Induksi Hg asetat (A) terhadap tikus percobaan secara intraperitoneal (B)

Dua hari kemudian dilakukan pengambilan darah dan organ hati, ginjal, paru, limpa dan jantung kemudian dilakukan pemeriksaan untuk menilai kadar Hg dalam plasma dan serum darah (A) dan perubahan pada gambaran histopatologi hati tikus (B) (Gambar 17).

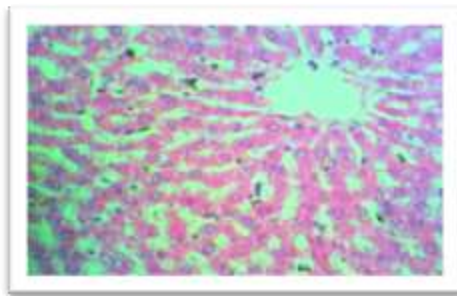


Gambar 17. Pengambilan serum dan plasma darah (A) dan organ hati, ginjal, paru, limpa dan jantung (B)

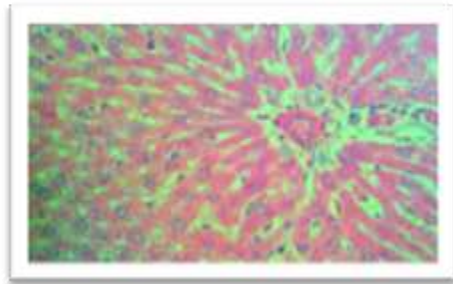
Perlakuan yang dilakukan tidak bersifat hepatotoksik, meskipun terdapat kerusakan patologi namun pada semua kelompok masih dalam tahap aman, kecuali kelompok control. Perlakuan yang dilakukan, kelompok kontrol menunjukkan renotoksisitas yang kuat ditandai adanya degenerasi lemak akut hingga nekrosis tubulus, sedangkan kelompok lain masih dalam tahap yang aman. Perlakuan tidak merusak paru-paru, jantung dan limpa (Gambar 18).



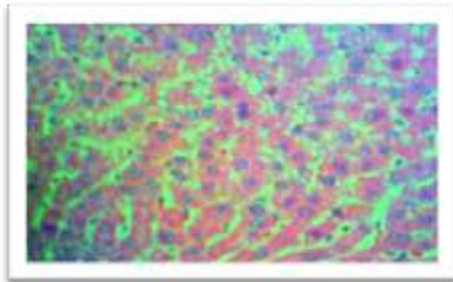
Dosis C : liver normal



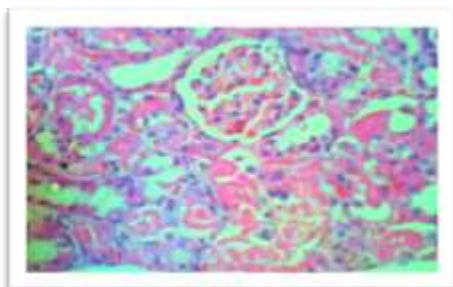
Dosis B : liver dengan degenerasi ringan



Dosis A : liver dengan degenerasi

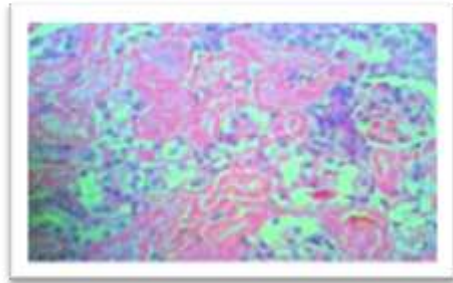


Kontrol : liver dengan degenerasi berat

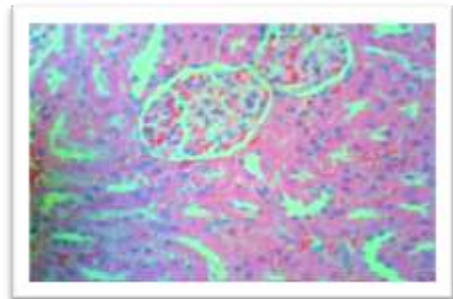


Dosis C : ginjal normal

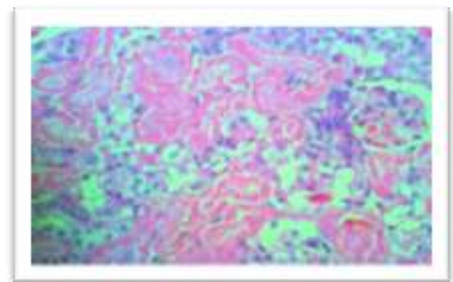




Dosis B : ginjal dengan degenerasi ringan



Dosis A : ginjal dengan degenerasi



Kontrol : ginjal dengan degenerasi berat

Gambar 18. Analisis Histopatologis organ Hati, Ginjal, Paru, Limpa dan Jantung Tikus Percobaan

**Hasil Analisis Histopatologis organ hati, Ginjal, Paru, Limpa dan Jantung Tikus Percobaan**

Hasil Skoring organ adalah sebagai berikut (Tabel 5.):

Tabel 5. Hasil Skoring organ hati, ginjal, paru, limpa dan jantung tikus

<b>Kelompok</b>	<b>Hati</b>	<b>Ginjal</b>	<b>Paru</b>	<b>jantung</b>	<b>Limpa</b>
Dosis C	0	0	0	0	0
Dosis B	1	1	0	0	0
Dosis A	2	2	0	0	0
Kontrol	4	4	0	0	0

Keterangan Skoring

Hati :

- 0 = Normal
- 1 = Degenerasi ringan fisiologis
- 2 = Toksisitas ringan, ditandai degenerasi hidropis hepatosit
- 3 = toksisitas sedang, ditandai degenerasi lemak hepatosit
- 4 = tosisitas kuat ditandai degenerasi lemak hingga nekrosa hepatosit

Ginjal :

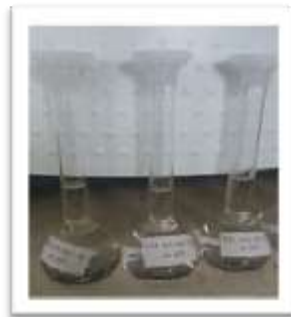
- 0 = Normal
- 1 = Degenerasi ringan fisiologis
- 2 = Toksisitas ringan, ditandai degenerasi hidropis tubulus
- 3 = toksisitas sedang, ditandai degenerasi lemak tubulus
- 4 = tosisitas kuat ditandai degenerasi lemak hingga nekrosa tubulus

Paru, jantung, Limpa

- 0 = Normal

### **Analisis Hg Plasma dan Serum Darah Tikus**

Analisis kadar Hg dalam plasma dan serum darah tikus dilakukan dengan Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS) di laboratorium BATAN (Gambar 19).



Gambar 19. Analisis Hg plasma dan serum darah tikus

Berdasarkan analisis tersebut diperoleh hasil bahwa kadar Hg tertinggi terdapat pada serum darah tikus kontrol dengan yaitu sebesar 3,091  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dan terendah perlakuan C yaitu sebesar 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (tidak terdeteksi). Hasil analisis Hg lengkap tercantum pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil analisis Hg plasma dan serum darah tikus

No.	Darah Tikus	Perlakuan	Kadar Hg ( $\mu\text{g/ml}$ )	Keterangan
1.	Serum	A	ttd	ttd = tidak terdeteksi
2.	Serum	B	ttd	
3.	Serum	C	ttd	
4.	Serum	Kontrol	3,091	
5.	Plasma	A	0,7605	
6.	Plasma	B	0,0923	
7.	Plasma	C	0,0326	
8.	Plasma	Kontrol	2,898	

Sedangkan kadar Hg tertinggi terdapat pada plasma darah tikus kontrol dengan yaitu sebesar 2,898  $\mu\text{g/ml}$  dan terendah perlakuan C yaitu sebesar 0,0326  $\mu\text{g/ml}$ .

**III. Pembuatan tortilla chips kaya kalsium dan protein, uji organoleptik, pengujian kadar protein dan kandungan Ca dan pengujian bioavailabilitas Ca.**

**Pembuatan tortilla chips kaya kalsium dan protein**

Proses pembuatan Tortilla Chips di laboratorium Pangan Program Studi Farmasi, FMIPA Universitas Pakuan adalah sebagai berikut :



A. Pemasakan Campuran Jagung dan Larutan Kapur



B. Perendaman



C. Pencucian



D. Penggilingan



E. Pembuatan Lembaran Tipis



F. Pencetakan Adonan



G. Pengeringan



H. Penggorengan



I. Hasil Akhir *Tortilla Chips*

### **Analisa Data**

Seluruh data dianalisa dengan menggunakan SPSS 12. Setelah dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji dari Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-wilk. Data formulasi adonan *Tortilla Chips*, diolah dengan menggunakan uji anova satu arah yang dilanjutkan dengan uji Bonferoni untuk menentukan batas kemaknaan dengan nilai  $p < 0,05$  karena data untuk kelompok perlakuan berdistribusi normal (Tabel 7).

Tabel 7. Formulasi adonan *Tortilla Chips*

Jenis Bahan	F1	F2	F3	F4	F5	Kontrol
Bahan baku						<i>Tortilla chips</i> komersial
Tepung Massa Jagung(g)	100	90	80	70	60	
Tepung kijang (g)	0	10	20	30	40	
Serbuk Nano kalsium (%) Dari berat bahan baku	5	5	5	5	5	
Garam(g)	3	3	3	3	3	
Bubuk Bawang Putih (g)	2	2	2	2	2	
Air (ml)	10	10	10	10	10	

### **Uji Organoleptik dengan Uji Kesukaan (Hedonik) (Soekarto, 1985)**

Pengujian organoleptik merupakan pengujian yang menggunakan indera manusia sebagai alat untuk mengukur daya penerimaan terhadap suatu produk makanan. adapun tujuan dari pengujian ini adalah untuk menentukan tingkat kesukaan dari konsumen terhadap produk yang telah dihasilkan.

Penentuan uji organoleptik dilakukan dengan uji hedonik terhadap kerenyahan, warna, kesan di mulut (*mouthfeel*), dan kenampakan yang dilakukan oleh 20 orang panelis untuk memberikan penilaian terhadap *tortilla chips* yang diperkaya serbuk nano kalsium dan tepung Kijing Taiwan (Gambar 20).



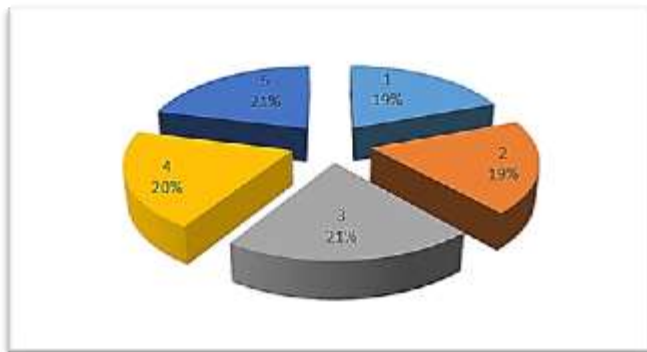
Gambar 20. Formula Uji Organoleptik *Tortilla chips*



Hasil terbaik dari uji hedonik tersebut akan dilanjutkan dengan pengujian bioavaibilitas Ca. Hasil uji organoleptik tortilla chips adalah sebagai berikut:

### **Aroma**

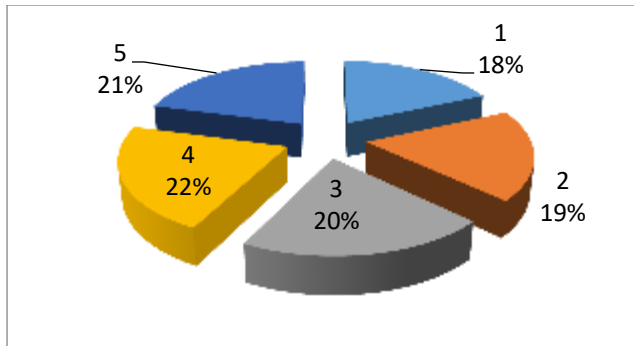
Aroma yang paling disukai adalah formula **Nano Ca 5%** yaitu sebesar 3,6 dan yang tidak disukai adalah formula tepung kijing3% (Gambar 21).



Gambar 21. Hasil uji organoleptik aroma tortilla chips

### **Rasa**

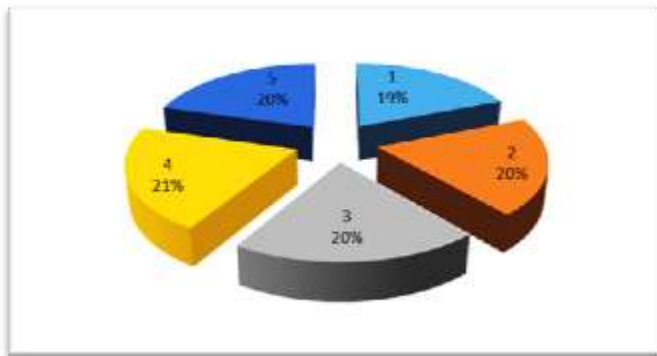
Rasa yang paling disukai adalah formula **Nano Ca 3%** yaitu sebesar 3,6 dan yang tidak disukai adalah tanpa penambahan apapun (Gambar 22).



Gambar 22. Hasil uji organoleptik rasa tortilla chips

### **Kerenyahan**

Kerenyahan yang paling disukai adalah formula **Nano Ca 3%** yaitu sebesar 3,5 dan yang tidak disukai adalah tanpa penambahan apapun (Gambar 23).

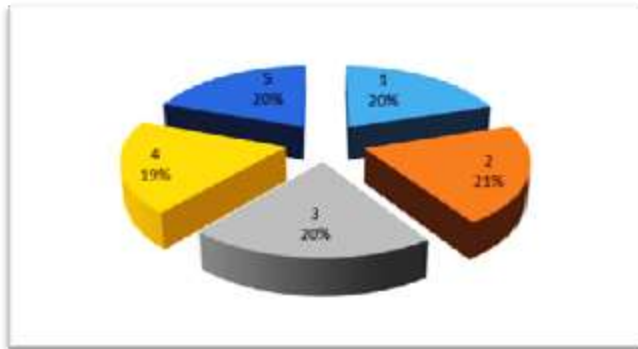


Gambar 23. Hasil uji organoleptic kerenyahan tortilla chips

### **Warna**

Warna yang paling disukai adalah formula Tepung 3% yaitu sebesar 3,55 dan yang tidak disukai adalah Nano Ca 3% (Gambar 24).

Untuk sementara, dapat disimpulkan bahwa fortifikasi Nano Ca 3% pada tortilla chips merupakan formula yang paling disukai oleh 20 panelis pada uji organoleptik. Formula tortilla chips ini selanjutnya akan diuji kandungan Ca dan proteinnya.



Gambar 24. Hasil uji organoleptikaroma tortilla chips

### **Pengujian Kadar Protein (Metoda Kjeldhal) dan Kandungan Ca dengan Menggunakan AAS**

Analisis kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode kjeldahl. Prinsip dari metode kjeldahl ini adalah pengukuran kadar protein secara tidak langsung dengan mengukur kadar nitrogen dalam sampel dengan cara destruksi, destilasi dan titrasi. Kadar protein yang dianalisis hanya pada formula yang paling diminati oleh panelis yaitu formula 3. Hasil kadar protein dalam sampel keripik jagung pada formula 3 diperoleh sebesar 8,49%. Rata-rata kadar protein yang memenuhi syarat SNI 2000 yakni harus lebih dari 5%. Pada

formula 3 kadar protein yang diperoleh sesuai dengan kadar air yang ditetapkan oleh SNI 2000. Menurut Winarno (2004) protein merupakan zat makanan yang penting bagi tubuh manusia, karena berfungsi sebagai bahan bakar dalam tubuh dan juga sebagai bahan pembangunan dan pengatur.

**Analisis Bioavailabilitas *in vitro* kalsium metode Dialisis (Miller *et. al* 1981, Sittikulwitit *et. al* 2004 dan Purwaningsih 2011)**

**A. Persiapan Alat dan Bahan.**

Semua peralatan gelas dicuci, direndam dalam larutan  $\text{HNO}_3$  10% (v/v) selama 24 jam dan dibilas dengan air bebas ion sebelum digunakan. Bahan meliputi : HCl 37%, suspensi Pepsin (1,6 g pepsin didispersikan ke dalam 0,1 M HCl dan ditepatkan volumenya menjadi 10 ml. suspensi ini dibuat sewaktu akan digunakan), Campuran pankreatin bile ( 1 g pankreatin dan 6,25 g ekstrak *bile* didispersikan dalam 0,1M  $\text{NaHCO}_3$  dan ditepatkan volumenya menjadi 250 ml. Campuran ini dibuat sewaktu akan digunakan), kantung Dialisis dengan panjang 20 cm dan kemudian direndam dalam air bebas ion sampai akan digunakan.

**B. Persiapan sampel.**

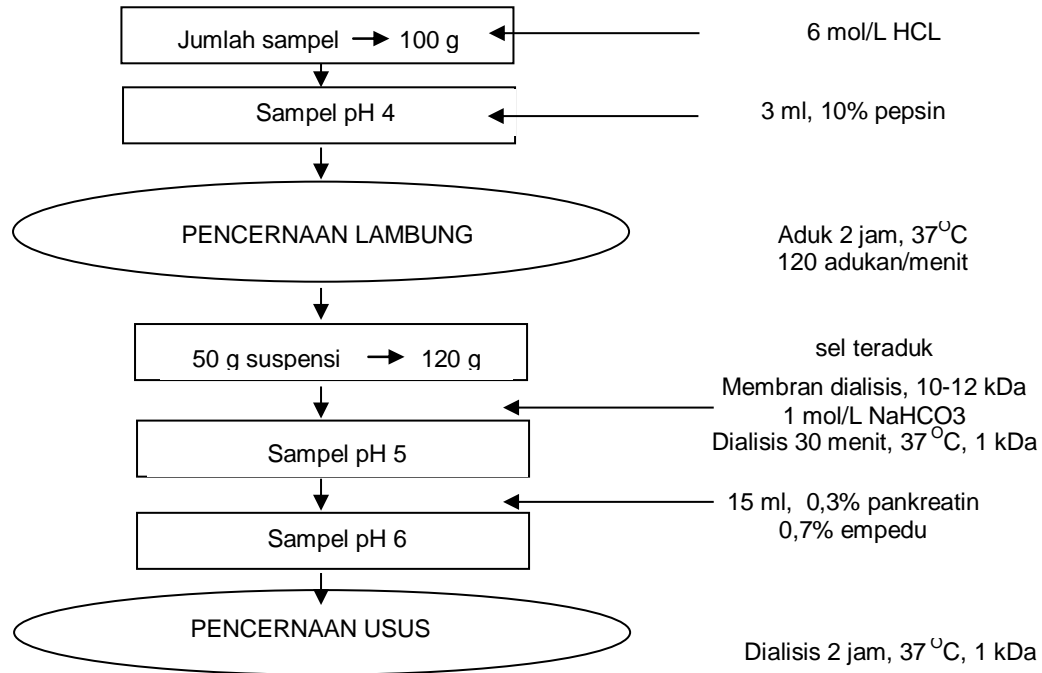
*Tortilla* diblender kering sampai menyerupai bubuk.

Ditimbang setara 2 gram protein

**C. Analisis ketersediaan kalsium.**

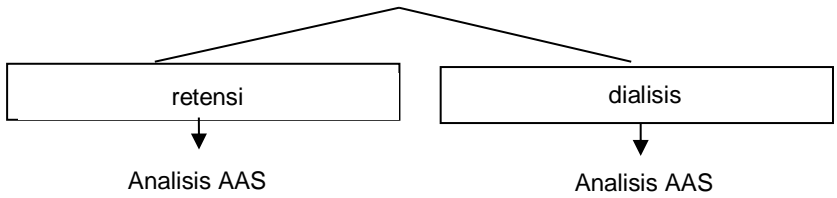
Kalsium sampel dihirolisis dari ikatannya dengan protein menggunakan enzim-enzim pencernaan yang terdapat di lambung dan usus halus. Kalsium bebas yang terdapat dalam larutan sampel akan berdifusi melalui membran semipermeabel ke dalam kantung dialisis yang berisi buffer  $\text{NaHCO}_3$ . Kalsium dalam dialisat menunjukkan jumlah kalsium yang diserap tubuh (Gambar 25A dan 25B).

*Detoksifikasi & Fortifikasi Nanokalsium Kerang*

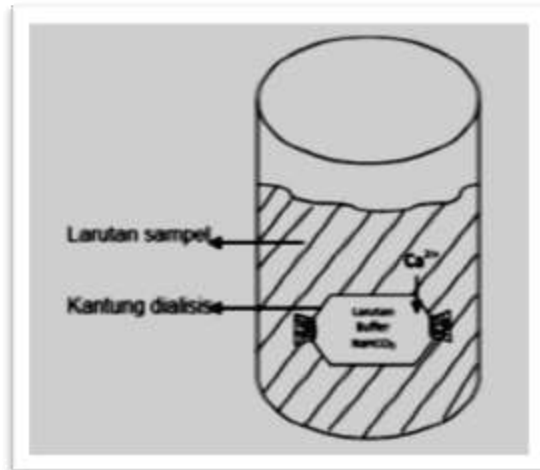


Gambar 25 A. Diagram Analisa Ketersediaan Kalsium (Bersambung ke halaman berikutnya)

Lanjutan dari halaman sebelumnya



Gambar 25A. Diagram Analisis Ketersediaan Kalsium



Gambar 25B. Pegujian Bioavailibilitas Ca metode Dialisis  
Sumber : Bosscher, et al.(2001);Purwaningsih ( 2011)

Perhitungan total Ca tercantum di halaman berikutnya.

- 1) Berat sampel setara 2 g protein =  $(2/\text{protein sampel}) \times 100$
- 2) % Kalsium =  $\frac{\frac{100}{1000} \times \text{fp} \times (\text{absorban sampel} - \text{absorban blanko})}{\text{mg sampel}} \times 100\%$
- 3) Kebutuhan  $\text{NaHCO}_3$  (g) =  $\left( N \text{ NaOH} \times \left( \frac{\text{NaOH (ml)}}{1000} \right) \times 40 \right) \times \left( \frac{100}{20} \right) \times \left( \frac{T1 (g)}{T2 (g)} \right)$
- 4) Bioavailabilitas Kalsium (%) =  $\frac{\text{mg kalsium dialisat}}{\text{mg kalsium sampel yang dianalisis}} \times 100\%$   
ket; fp = faktor pengenceran (1 dan 10)
- 5) Total Ca tersedia (mg/100g) = Ca sampel (mg/100 g) x (% Bioavailabilitas)

Bioavailabilitas dapat dianalisis dengan cara *in vitro* yang memiliki keuntungan lebih cepat, murah, dan mudah dikontrol. Secara *in vitro* dilakukan simulasi pencernaan dalam wadah menggunakan bufer enzim pencernaan yaitu pepsin secara tunggal atau diikuti dengan tripsin sendiri atau bersama dengan kimotripsin dalam bufer dengan pH yang sesuai. Jumlah mineral target yang terlepas dari matrix pangan dan terdapat secara bebas dalam wadah dapat dipisahkan dengan menggunakan membran dialisis dengan pori-pori yang sesuai. Dialisat yang mengandung mineral target lalu dianalisis dengan metode spektrofotometer penyerapan atom (AAS).

Analisis yang dapat dilakukan sangat bervariasi tergantung dari metode analisis kimia yang tersedia, tetapi secara singkat pertama-tama dilakukan pengabuan lalu pengenceran dan diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang yang sesuai (Harris & Karmas 1988). Dialisis merupakan proses pemurnian suatu sistem koloid dari



partikel-partikel bermuatan yang menempel pada permukaan. Pada proses digunakan selaput semi permeable (Ratna *et al.* 2011). Prinsip metode dialisis ini adalah memisahkan molekul terlarut berdasarkan berat molekulnya secara difusi (Zakaria *et al.* 1997).

Salah satu enzim yang berperan dalam penyerapan adalah pepsin. Pepsin merupakan golongan dari enzim endopeptidase, yang dapat menghidrolisis ikatan-ikatan peptida pada bagian tengah sepanjang rantai polipeptida dan bekerja optimum pada pH 2 dan stabil pada pH 2-5. Enzim ini bekerja dengan memecah protein menjadi proteosa dan pepton. Enzim tersebut akan mendestruksi protein dalam sampel (Del valle 1981). Sedangkan enzim lain yang juga digunakan adalah pankreatin bile yang berfungsi memecah ikatan protein sampel agar nanti hasil protein yang dipecah dapat sesuai dengan diameter kantung dialisis.

Analisis ini bertujuan mengetahui ketersediaan mineral didalam tubuh. Mineral yang dianalisis ialah kalsium. Sampel yang dianalisis ialah tortilla chips dengan penambahan nano tepung Kijing Taiwan beberapa komposisi. Sampel dianalisis duplo, yang hasilnya kemudian dirata-ratakan. Hasil perhitungan bioavailabilitas kalsium disajikan pada Tabel 8.

Berdasarkan hasil perhitungan, nilai bioavailabilitas terendah adalah tortilla chips tanpa penambahan Nano Kijing

Taiwan (kontrol 0%), sedangkan makanan bayi dengan nilai bioavailabilitas tertinggi adalah penambahan Nano 5%. Karena nilai bioavailabilitasnya yang rendah, jumlah total kalsium pada kontrol yang tersedia juga rendah, yaitu 16,47 mg dalam 100 g sampel dan 4,12 mg pada tiap *serving size*. Kontribusi AKG dihitung berdasarkan kebutuhan kalsium balita usia 1-5 tahun, yaitu 300 mg, dan 6-10 tahun, yaitu 400mg. Kontrol (0%) memberikan kontribusi yang terendah terhadap kebutuhan kalsium balita, yaitu 1,37% dan 1,03% dari AKG. Sampel yang memberikan kontribusi kalsium tertinggi adalah Nano 5% dengan kontribusi AKG sebesar 11,82% dan 8,86% dari AKG.

Nilai bioavailabilitas dan kontribusi AKG kalsium pada sampel C yang tinggi, dapat dikarenakan tingginya kadar protein sampel C yaitu 42%. Proses absorpsi kalsium dalam tubuh didorong oleh vitamin C, vitamin D dan protein. Sedangkan asam oksalat (pada bayam) dan asam fitat (pada dedak padi) menghambat absorpsi kalsium.

Tabel 8. Bioavailabilitas dan kontribusi AKG kalsium

No.	Kode sampel	Bioavailabilitas Ca	Total Ca Tersedia		Kontribusi AKG (%)	
		%	mg /100 g	mg / serving size	0-6 bulan	7-12 bulan
1	A	12.24	25.19	6.30	2.10	1.57
2	B	4.00	16.47	4.12	1.37	1.03
3	C	34.47	73.86	35.45	11.82	8.86
4	D	18.06	54.18	21.67	7.22	5.41
5	E	9.94	29.81	11.93	3.98	2.98

Jumlah kalsium cukup banyak di dalam tubuh yaitu sekitar 2% dari berat badan. Sekitar 99% kalsium dalam tubuh berada dalam tulang (Almatsier 2001).

## 5. KESIMPULAN NANOKALSIUM CANGKANG *A. woodiana*

### Kesimpulan

Mineral merupakan zat gizi mikro yang penting bagi tubuh. Beberapa mineral yang penting adalah kalsium, besi, dan seng. Jumlah mineral yang diserap bergantung pada ada tidaknya zat penghambat dan pendorong dalam penyerapan, serta nilai bioavailabilitas dari mineral tersebut. Bioavailabilitas dapat dianalisis dengan cara *in vitro* yang memiliki keuntungan lebih cepat, murah, dan mudah dikontrol.

Berdasarkan hasil penelitian, *tortilla chips* dengan nilai ketersediaan serta memberikan kontribusi AKG terbaik adalah dengan penambahan nano tepung Kijing Taiwan 5%. Urutan sampel dengan bioavailabilitas serta kontribusi AKG tertinggi ialah Nano 5%, Nano 3% dan kontrol (0%).

## **Saran**

Penelitian sebaiknya dilakukan dalam kondisi optimum dan penelitian dilaksanakan dengan lebih cermat dan teliti dalam melakukan setiap tahapan pengujian. Setiap tahapan pengujian sebaiknya dilakukan dalam waktu yang tepat dan tidak disimpan lama.

## **6. BAHAN BACAAN**



- Acevedo R, Bubert AS, Guevara MJ, Belmar M. 2010. *Microstructure of Calcite and Aragonite in Some Chilean Gastropods and Bivalves Molluscs*. Chili: Facultad de Ingenieria, Universidad Mayor.
- Almatsier S. 2009. *Basic principles of nutrition science*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Aung EM, Kywe TT, Oo MM. 2008. Enzymatic deproteinization process for chitin recovery out of shrimp shell wastes. Di dalam: *Issue and Prospects for the GMS; Myanmar, 12-14 Nov 2008*. Myanmar: International Conference on Sustainable Development.
- Cotton FA, Wilkinson G. 2007. *Basic Inorganic Chemistry*. Jhon Willey Son Inc.
- Darmono. 1995. *Metals in Biological Systems of Living Things*. Jakarta: UI-Press.
- Delong MD, Thorp JH. 2009. Mollusc shell periostracum as an alternative to tissue in isotopic studies. *J. Limnology and Oceanography* 7: 436-441.
- Greiner R. 2009. Current and projected of nanotechnology in the food sector. *Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition* 34(1): 243-260.
- Keenan CW, Kleinfelter DC, Wood JH. 1980. *General College Chemistry (Sixth Edition)*. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Kenth S. 2009. *Investigation of Femtosecond Laser Technology for the Fabrication of Drug Nanocrystals in Suspension*. Sciences Pharmaceutiques, Université de Montréal.
- Khalil. 2006. Effect of milling and baking on mineral content and physical properties of the skin pensi (*Corbiculla* sp.) For feed. *Media Peternakan* 29 (2): 70-75.
- Lee JS, Joo JY, Park JJ. 2007. Histology and ultrastructure of the mantle epidermis of the equilateral Venus, *Gomphina veneriformis*. *Journal of Shellfisheries Research*. [Http://findarticles.com/p/articles](http://findarticles.com/p/articles) [3 Oktober 2011].
- Mahmoud NS, Ghaly AE, Arab F. 2007. Unconventional approach for demineralization of deproteinized crustacean shells for chitin production. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 3(1): 1-9.
- Mohanraj VJ, Chen Y. 2006. Nanoparticles – a riview. *Journal of Pharmaceutical Research* 5(1): 561-573.
- Muller RH, Keck CM. 2004. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of Biotechnology* 113: 151-170.
- Purwasasmita BS, Gultom RS. 2008. Synthesis and characterization of hydroxyapatite powder sub-micron scale using precipitation method. *Journal of Life and Physical Sciences* 10 (2): 155-167.
- Saksono N, Mubarak MH, Widaningroem R, Bismo S. 2007. Influence of magnetic field on the conductivity of a solution of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and  $\text{CaCl}_2$  and precipitation and the morphology of  $\text{CaCO}_3$  particles in a static fluid system. *Jurnal Teknologi* 4: 317-323.
- Suptijah P. 2009. Nano Calcium sources Aquatic Animals. Inside: 101 Innovation Indonesia. Ministry of State for Research and Technology. Jakarta.
- Suzuki M, Murayama E, Inoue H, Ozaki N, Tohse H, Kogure T, Nagasawa H. 2004. Characterization of Prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster (*Pinctada fucata*). *J.Biochem* 382: 205-213.



## Sertifikat Kompetensi Penulis (BNSP)

4785177



BADAN NASIONAL  
SERTIFIKASI PROFESI  
INDONESIAN PROFESSIONAL  
CERTIFICATION AUTHORITY

### SERTIFIKAT KOMPETENSI CERTIFICATE OF COMPETENCE

No. 58110 26411 0 0000177 2019

Dengan ini menyatakan bahwa,  
*This is to certify that,*

**Dr. Sata Yoshida Srie Rahayu, M.Si.**

No. Reg. KOM.1446.00177 2019

Telah memenuhi persyaratan dan kompeten pada kualifikasi:  
*Meet the requirements and competent for the below qualification:*

**Penulisan Buku Nonfiksi  
Non-fiction Book Writing**

Pada Bidang Pekerjaan:  
*In the area of:*



**Penulis Buku Nonfiksi  
Non-fiction Book Writer**

Sertifikat ini berlaku untuk: 3 (tiga) Tahun  
*This certificate is valid for: 3 (three) Years*


Jakarta, 7 Juni 2019

Atas Nama Badan Nasional Sertifikasi Profesi  
*On Behalf of Indonesian Professional Certification Authority*

Lembaga Sertifikasi Profesi Penulis dan Editor Profesional  
*Professional Certification Body for Professional Writer and Editor*



Bambang Trismansyah  
Direktur  
Director





**P**encemar merkuri limbah tambang emas diduga merupakan penyebab kematian banyak biota di sungai Cikaniki Kabupaten Bogor, di hulu sungai ini terdapat pertambangan resmi milik PT Aneka Tambang dan pertambangan emas tidak resmi yang biasa disebut pertambangan emas tanpa ijin (PETI). Pencemaran merkuri di sungai Cikaniki sangat membahayakan, karena sungai ini merupakan salah satu sumber bahan baku air bersih PDAM Bogor dan Tangerang. Kehadiran merkuri terus menerus di perairan menimbulkan stres (cekaman) bagi biota air. Buku ini akan mengevaluasi pemanfaatan kerang *Pilsbryconcha exilis* untuk bioremediasi perairan yang tercemar merkuri, serta mengatasi masalah strategis berskala nasional tentang ketahanan dan keamanan pangan, khususnya bahan pangan yang berasal dari perairan tercemar logam berat. Pada bagian selanjutnya, dibahas pula tentang teknologi pembuatan serbuk nano kalsium dengan kadar kalsium yaitu sebesar 92%. Serbuk nano kalsium juga mengandung mineral lainnya yaitu natrium (7,2%), kalium (0,08%), magnesium (0,3%), fosfor (0,11%), mangan (0,03%), seng (0,02%), dan besi (0,01%). Pemberian suplemen Nano Ca terhadap keracunan merkuri mengurangi penipisan gelar nekrotik dan degenerasi hepatosit. Selain itu, suplementasi nano Ca mengalami penurunan konsentrasi Hg pada baik plasma maupun serum darah tikus. *Tortilla chips* dengan penambahan 5% nanokalsium *Anodonta woodiana* menghasilkan bioavailabilitas dan Angka Kecukupan Gizi tertinggi.

ISBN 978-623-71228-1-7

