

# KHELASI PLUMBUM (Pb) DAN CADMIUM (Cd) MENGGUNAKAN ASAM SITRAT PADA BIJI KEDELAI

Chelation of Plumbum and Cadmium by Citric Acid in Soybean Seeds

Sapto Priyadi<sup>1</sup>, Purnama Darmaji<sup>2</sup>, Umar Santoso<sup>2</sup>, Pudji Hastuti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Tunas Pembangunan,  
Jl. Balekambang Lor No. 1 Surakarta 57139

<sup>2</sup>Program Studi Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada,  
Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281  
Email: utp\_ska@yahoo.com

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang khelasi plumbum (pb) dan cadmium (cd) menggunakan asam sitrat pada biji kedelai, dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh faktor perlakuan khelasi (ratio pengkhelat, waktu kontak dan kondisi biji) dalam mereduksi Pb dan Cd pada biji kedelai. Faktor penelitian meliputi 1) rasio pengkhelat (asam sitrat/C) yang terdiri dari tiga taraf (1, 2 dan 3 gram asam sitrat); 2) waktu kontak (D) yang terdiri dari tiga taraf (90, 120 dan 180 menit) serta faktor ke-3) kondisi biji (E) yang terdiri dari tiga taraf (utuh yaitu lolos pada saringan 0.3 inch dan tertahan pada 0.2 inch, pecah yaitu tertahan pada saringan 10 mesh dan tepung yaitu lolos pada saringan 50 mesh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ketiga faktor, mampu mereduksi Cd secara maksimal (tidak terdeteksi/batas deteksi 0,01 ppm). Reduksi Pb tertinggi adalah maksimal (tidak terdeteksi/batas deteksi 0,09 ppm) terjadi pada perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>; C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>; C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>. Kombinasi antara pengkhelat "asam sitrat" (C) dengan waktu kontak (D) menunjukkan berbeda nyata dan keduanya menunjukkan interaksi, reduksi tertinggi dicapai perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>. Kombinasi antara pengkhelat "asam sitrat" (C) dengan kondisi biji (E) menunjukkan berbeda nyata dan keduanya tidak ada interaksi, reduksi tertinggi dicapai perlakuan C<sub>2</sub>E<sub>1</sub>. Kombinasi antara waktu kontak (D) dengan kondisi biji (E) menunjukkan berbeda nyata dan tidak ada interaksi, reduksi tertinggi dicapai perlakuan D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> dan D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>.

**Kata kunci:** khelasi, plumbum, cadmium dan kedelai

## ABSTRACT

A study on the chelation of plumbum and cadmium by citric acid in soybean seeds, it was aimed to identify the effect of chelation treatment (chelating ratio, time contact and seeds condition) on plumbum reduction and cadmium in soybean seeds. A factors of research covering 1<sup>st</sup>) chelating ratio (citric acid/"C") consisting of three (1, 2 and 3 grams of citric acid); 2<sup>nd</sup>) the time contact ("D") consisting of three (90, 120 and 180 minutes) and the 3<sup>rd</sup> factors is condition of the seeds ("E") consisting of three standard (whole qualify e.i. passing sieve of 0.3 inch and restrained at 0.2 inch), ruptured e.i. restrained for sieve at 10 mesh, and flour qualify for pass for sieves 50 mesh. The result showed that the combination of three factors were able to reduce Cd maximally (non detected/detect limit 0.01 ppm). Reduction Pb maximally (non detected /detect limit 0.09 ppm) occured in treatment C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>. A combination of citric acid chelation (C) with the time contact (D) showing significant difference and both showed interactions, the reduction of the highest was C<sub>1</sub>D<sub>1</sub> treatment. A combination of citric acid chelation (C) with the condition of the nut (E) showed significant difference and both no interaction, the reduction of the highest was C<sub>2</sub>E<sub>1</sub> treatment. The combination between the time of contact (D) with the condition of the seed (E) showed significant difference and both no interaction, the reduction of the highest were D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> and D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> treatments.

**Keywords:** chelation, plumbum, cadmium and soybean

## PENDAHULUAN

Pencemaran logam berat pada lahan pertanian merupakan masalah lingkungan pada umumnya, yang dapat mengurangi produktivitas tanaman dan keamanan produk sebagai pangan dan pakan (Zheljzkov, dkk. 2006). Sumber pencemaran dapat berupa residu bahan agrokimia seperti pupuk dan pestisida yang dalam penggunaannya cenderung berlebihan serta limbah industri yang menggunakan bahan kimia tertentu dan pengolahan limbahnya kurang baik. Kadmium (Cd) yang tersebar dalam lingkungan alam dengan kegiatan manusia maupun proses mineralisasi batuan alam (Drazic dan Mihailovic, 2005). Kadar Pb dan Cd yang tinggi berimplikasi terhadap kesehatan. Plumbum menyebabkan anemia dan defisiensi hemoglobin, disfungsi ginjal dan kerusakan otak (*neuropathy*). Cadmium dapat memotivasi demineralisasi tulang, meningkatkan kerapuhan tulang dan risiko fraktur, menyebabkan timbulnya anemia dan hipertensi, pada testis menyebabkan hiperplasia yang merupakan permulaan terjadinya kanker. Masuknya Pb dan Cd ke dalam makhluk hidup dapat melalui pangan dan air minum, inhalasi udara dan penetrasi melalui kulit (Balija dkk., 2005).

Umumnya masuknya Cd dalam tanah pertanian disebabkan oleh aplikasi pupuk fosfat (Drazic dan Mihailovic, 2005). Apabila pupuk tersebut digunakan secara terus menerus dengan dosis dan intensitas yang tinggi dapat meningkatkan Pb dan Cd yang tersedia dalam tanah, sehingga meningkatkan serapan Pb dan Cd oleh tanaman (Charlena, 2004); diangkut melalui pembuluh *xylem* dan didistribusikan pembuluh *phloem* hingga mencapai biji dalam bentuk X-S-Cd (Mendoza-Co'zatl dkk., 2011).

Tanaman kedelai memiliki kapasitas yang besar untuk menyerap Cd tanah. Cadmium dalam jaringan tumbuhan berada dalam urutan akar > batang > daun. Keadaan tersebut menunjukkan arah perjalanan Cd dalam sistem tanah tanaman. Lebih lanjut dijelaskan bahwa dengan penambahan Cd ke dalam media tanam ( $5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) menyebabkan akumulasi Cd pada jaringan tanaman kedelai meningkat, yang secara berturut-turut kandungan ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) dalam akar ( $120,63 \pm 7,19$ ), batang ( $88,40 \pm 4,33$ ) dan daun ( $45,35 \pm 2,61$ ) (Yong dkk., 2008). Hasil penelitian serupa tentang kandungan Cd dalam jaringan tanaman kedelai biji (*cotyledons*), yaitu sebelum dan sesudah perlakuan dengan penambahan Cd ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ke dalam media tanam, masing-masing  $48 \pm 5,2 \text{ mg kg}^{-1}$  dan  $61 \pm 7,2 \text{ mg kg}^{-1}$  (Drazic and Mihailovic, 2004).

Menurut Swift (1989) dan Alimin dkk. (2005) dalam Ariyanto (2006) menyatakan bahwa deprotonasi gugus-gugus fungsional asam humat akan menurunkan kemampuan pembentukan ikatan hidrogen, baik antar molekul maupun sesama molekul dan meningkatkan jumlah muatan negatif

gugus fungsional asam humat, sehingga akan meningkatkan gaya tolak-menolak antar gugus dalam molekul asam humat.

Meningkatnya pH akan menyebabkan ikatan hidrogen semakin lemah sehingga agregat akan terpisah satu sama lain. Keadaan tersebut dipengaruhi oleh disosiasi gugus fungsional yang bersifat asam pada asam humat seperti  $-\text{COOH}$ . Umumnya gugus  $-\text{COOH}$  terdisosiasi pada pH sekitar 4-5, sedangkan gugus  $-\text{OH}$  fenolat atau  $-\text{OH}$  alkoholat terdisosiasi pada pH sekitar 8 – 10. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa pada pH yang relatif tinggi akan meningkatkan konsentrasi  $-\text{COO}^-$  yang dapat berfungsi sebagai ligan (Herjuna, 2011). Jumlah proton yang terlepas juga ditentukan oleh pH lingkungan. Pengaruh pH terhadap pelepasan proton dapat dikaitkan dengan nilai pKa-nya. Nilai pKa adalah pH sistem larutan pada saat konsentrasi asam sama dengan konsentrasi konjugatnya (sisa asam). Nilai pKa asam sitrat masing-masing 3,13; 4,76 dan 6,4. Apabila pH lingkungan di atas nilai pKa-nya, maka proton dalam asam itu terlepas semua, sebaliknya apabila pH di bawah pKa-nya maka senyawa organik ini ada dalam bentuk asam dan tidak bermuatan. Pada pH kurang dari 3 semua asam organik tertekan, sehingga asam tidak bermuatan. Pada pH antara 3 dan 9 merupakan daerah disosiasi gugus karboksil, dan pada pH lebih besar dari 9 merupakan daerah disosiasi gugus OH fenolat (Ismail dan Hanudin, 2005). Umumnya gugus  $-\text{COOH}$  terdisosiasi pada pH sekitar 4-5, sedangkan gugus  $-\text{OH}$  fenolat atau  $-\text{OH}$  alkoholat terdisosiasi pada pH sekitar 8-10 (Ariyanto, 2006).

Menurut Zander (2009) kemampuan recovery sangat tergantung pada pH. Pada pH <5, efektivitas khelasi Cd kurang dari 20%, tetapi meningkat menjadi hampir  $\text{nd} = 0,09$  ppm pada pH 7. Di sisi lain kapasitas tukar kation maksimum logam berat juga tergantung pada pH, misalnya Pb pada pH 6,0 dan Cd pada pH 4,5 (Sridhar, dkk., 2009). Peneliti lain menyatakan bahwa khelasi maksimum Cd berlangsung pada pH 5, dan Pb pada pH 4 (Shaha, dkk. 2008).

Asam organik yang memiliki gugus fungsional  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$  phenolat maupun  $-\text{OH}$  alkoholit, mempunyai peluang untuk membentuk kompleks dengan ion logam (Ariyanto, 2006). Khelasi menggunakan asam organik akan meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi pengkhelat. Tingginya konsentrasi materi organik larut air mampu menarik ion logam kembali ke air dan membentuk kompleks (Setiawan, 2008).

Kereaktifan asam merupakan daya gabung dari anion organik dengan kation yang berada pada permukaan mineral dan yang terlepas dari kristal (Ismail dan Hanudin, 2005).

Keasaman asam sitrat didapatkan dari tiga gugus karboksilat  $\text{COOH}$  yang dapat melepas proton ( $\text{H}^+$ ) dalam larutan. Ion  $\text{H}^+$  pertama akan dilepas pada pH 3,  $\text{H}^+$  kedua

dilepas pada pH 7 dan H<sup>+</sup> ketiga dilepas pada pH 10. Proton sudah dilepas dalam larutan yang sangat asam. Dalam keadaan ini yang tersisa adalah ligan oksida, yang akan dilepaskan jika ion pusat tereduksi menjadi bervalensi yang lebih rendah (Purwanto, 2012).

Kapasitas tukar kation maksimum logam berat tergantung pada waktu kontak dan jenis logam. Menurut Shaha dkk. (2008) kecepatan pertukaran ion logam, waktu yang diperlukan untuk pertukaran 50% logam Cd adalah 3 jam dan Pb adalah 48 menit. Menurut Sridhar dkk. (2009) waktu paruh untuk Pb setelah 20 menit dan Cd setelah 2 jam.

Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan informasi ilmiah tentang teknologi proses penurunan timbal (Pb) dan kadmium (Cd) pada biji kedelai melalui aplikasi asam sitrat sebagai chelating agent; khususnya untuk mengetahui pengaruh faktor perlakuan khelasi (ratio pengkhelat, waktu kontak dan kondisi biji) dalam mereduksi Pb dan Cd pada biji kedelai.

## METODE PENELITIAN

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia untuk analisis. Bahan utama berupa biji kedelai yang dalam teknik budidayanya menggunakan bahan agrokimia, pengkhelat asam sitrat, *swelling agent* N,N-dimethylformamide (DMF), katalis sodium hypophosphite monohydrate, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl, NaOH, HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> dan larutan standar Pb dan Cd. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *magnetic stirrer*, *erlenmeyer flaks*, pH meter, oven, penangas listrik dan Atomic Absorption Spectrophotometer-flame (AAS Jena ContrAA 300).

### Pelaksanaan Penelitian

**Remediasi biji kedelai.** Ini dilakukan melalui khelasi Pb dan Cd dengan menggunakan asam sitrat yang dilarutkan dalam DMF 15 ml pada pH 10, dengan kondisi biji (sesuai perlakuan), selama waktu kontak (sesuai perlakuan) pada suhu 80°C dengan katalis NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (1 g), menurut metode (Mosieretal., 2005 dalam Li dkk., 2010) yang dimodifikasi. Setelah reaksi berlangsung dilakukan pemisahan padatan dan pelarut, residu asam sitrat dicuci dengan etanol 96% dan air deionized, residu DMF pada padatan dikeringkan pada 60 °C selama 12 jam (Li dkk., 2010). Akhirnya padatan siap dianalisis Pb dan Cd dengan AAS yang sebelumnya dilakukan preparasi sampel (destruksi basah).

**Persiapan pengujian.** Sebelum dilakukan pengujian residu Pb dan Cd, sampel uji dilakukan destruksi basah

dengan prosedur kerja sebagai berikut: a) sebanyak 5 gram bahan dimasukkan ke dalam erlenmeyer; b) tambahkan 40 ml asam sitrat – perklorat (2:1); c) Erlenmeyer diletakkan di atas penangas listrik, suhunya diatur pada suhu rendah (100 °C); setelah larutan dalam erlenmeyer mulai mendidih (asap merah akan hilang); d) pemanasan dilanjutkan sampai air dan asam nitrat hilang; e) setelah reaksi antara sampel dengan asam perklorat sempurna (dapat diidentifikasi dengan hilangnya effervescent), gunakan pemanas yang tinggi (170 °C) sampai jernih dan timbul asap putih. Hindari pemanasan yang membuat sampel hingga mengering, karena akan terjadi letupan; f) turunkan erlenmeyer dari penangas listrik dan biarkan dingin; g) pindahkan sampel yang telah didigesti ke dalam labu takar 25 ml dan tambahkan aquades sampai batas tanda dan h) baca larutan dengan AAS-flame yang telah dikalibrasi sebelumnya. Preparasi dan pengukuran konsentrasi Pb dan Cd: a) pembuatan larutan baku Pb dan Cd (100µg per ml), yaitu dengan memipet 10 ml Pb atau Cd ke dalam labu ukur 100 ml; b) tepatkan dengan larutan pengencer sampai tanda tera; c) buat larutan kerja dengan mengencerkan larutan induk Pb atau Cd (100µg per ml) hingga diperoleh kadar Pb atau Cd 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 dan 3,2 µg per ml; d) ukur masing-masing larutan kerja yang telah dipersiapkan dengan panjang gelombang untuk Pb = 217 nm dan Cd = 228 nm; e) buat kurva kalibrasi untuk mendapatkan garis regresi dan f) lanjutkan dengan pengukuran sampel uji yang sudah dipersiapkan. Perhitungan konsentrasi Pb atau Cd, yaitu dengan formula sebagai berikut:  $C = A \times (25\text{ml}/B)$ , dimana A = konsentrasi yang didapat dari hasil pengukuran, B = berat sampel dalam gram dan C = konsentrasi Pb atau Cd (Association of Official Analytical Chemist, 2005 dan Gonzales and Herrador, 2007).

### Rancangan Percobaan

Penelitian ini disusun dalam rancangan acak lengkap faktorial. Berdasarkan analisis varian apabila diketahui adanya perlakuan yang berbeda nyata dan untuk mengetahui perlakuan mana yang terbaik dalam mereduksi Pb dan Cd, maka dilanjutkan dengan analisis DMRT (Duncan's Multiple Range Test) 5%. Penelitian ini merupakan tahapan kegiatan remediasi biji kedelai dengan faktor khelasi dasar yang direkomendasikan dari penelitian sebelumnya, yaitu ratio *swelling agent (DMF)* dan kondisi pH. Faktor perlakuan dalam penelitian ini terdiri dari 1) ratio pengkhelat (1, 2 dan 3 gram asam sitrat); 2) waktu kontak (90, 120 dan 180 menit) serta faktor ke-3) kondisi biji kedelai dengan taraf: utuh (lolos pada saringan 0.3 inch dan tertahan pada 0.2 inch, pecah (tertahan pada saringan 10 mesh) dan tepung (lolos pada saringan 50 mesh).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Reduksi Cadmium (Cd) pada Biji Kedelai**

Berdasarkan hasil analisis menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer-flame*) sebagaimana disajikan pada Tabel 1, diketahui bahwa kombinasi ketiga perlakuan (asam sitrat – waktu kontak – kondisi biji) pada berbagai taraf yang disinergiskan dengan DMF 15 ml dan dikondisikan pada pH 10 mampu mereduksi Cd secara maksimal (tidak terdeteksi – batas deteksi 0,01 ppm).

Tabel 1. Reduksi Cd (%) pada biji kedelai dengan pengkhelat asam sitrat (C), Waktu kontak (D) dan kondisi biji (E)

Perlakuan			Reduksi Cd (%)
C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>1</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>2</sub> E <sub>1</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>1</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>2</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>2</sub> E <sub>2</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>2</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>1</sub> E <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>1</sub> E <sub>3</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>2</sub> E <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> E <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>2</sub> E <sub>3</sub>	nd
C <sub>1</sub> D <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> D <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	C <sub>3</sub> D <sub>3</sub> E <sub>3</sub>	nd

Perihal tersebut menunjukkan bahwa asam sitrat sebagai *chelating agent* yang dengan tiga gugus fungsional karboksilnya (-COOH) yang dikondisikan pada pH 10 dalam waktu kontak tertentu, atom hidrogen (H) mengalami deprotonasi. Lepasnya ion H<sup>+</sup> (proton) yang potensial ionisasinya besar dapat masuk ke dalam kisi-kisi dan mampu menggantikan kedudukan kation penyeimbang berpeluang membentuk kompleks dengan ion logam (Cd) dan terjadilah khelasi. Khelasi adalah reaksi keseimbangan antara ion logam dengan agen pengikat (pengkhelat) yang dicirikan dengan terbentuknya lebih dari satu ikatan antara logam tersebut dengan molekul agen pengkhelat dan menyebabkan terbentuknya struktur cincin yang mengelilingi logam tersebut. Asam sitrat merupakan *chelating agent* yang sesuai untuk dekontaminasi logam seperti Pb dan Cd, karena relatif murah, efektif, mudah ditangani dan memiliki afinitas yang relatif rendah untuk logam alkali seperti Ca, K dan Mg (Bassi dkk., 2000 dalam Ullah, 2007). Gugus fungsional karboksil

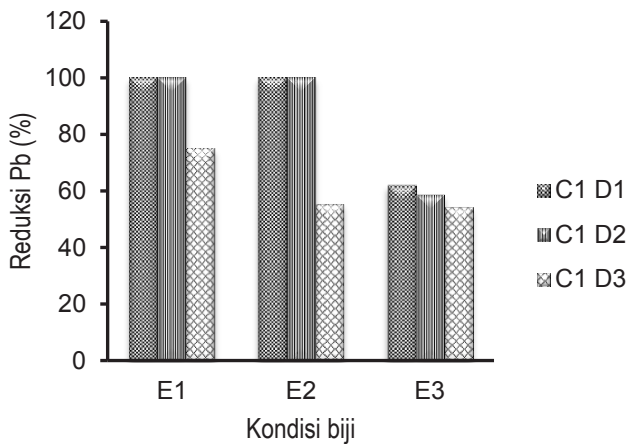
(-COOH) yang terikat pada makromolekuler (asam sitrat) akan terurai akibat adanya perubahan pH dan membentuk muatan negatif yang menyebabkan gugus fungsional tersebut akan bersifat “pseudo penukaran ion” (menjadi aktif). Atom hidrogen (H) pada gugus karboksil (-COOH) dapat dilepaskan sebagai ion H<sup>+</sup> (proton) atau deprotonasi. Gugus (-COOH) dapat mengalami deprotonasi pada pH yang relatif tinggi, sehingga mempunyai peluang membentuk kompleks dengan ion logam yang disebut khelasi (Marshall dkk., 1999 dalam Li dkk., 2010).

Ion H ini karena ukurannya yang kecil (r = 0,3A) dan potensial ionisasinya yang besar dapat masuk ke dalam kisi-kisi dan mampu menggantikan kedudukan kation penyeimbang yang ada di dalam kisi-kisi. Semakin kecil jari-jari atom, maka nilai keelektronegatifan semakin besar. Sifat keelektronegatifan sama dengan energi ionisasi dan afinitas elektron. Keelektronegatifan adalah kemampuan suatu atom untuk menarik elektron. Derajat keasaman (pH) lingkungan khelasi menentukan jumlah proton yang terlepas (deprotonasi). Ion H dapat dihasilkan dari disosiasi asam-asam organik. Meningkatnya pH lingkungan akan membuat gugus fungsional asam organik menjadi aktif. Asam adalah spesi yang memberikan (donor) proton (H<sup>+</sup>). Pengaruh pH terhadap pelepasan proton dapat dikaitkan dengan nilai pKa-nya. Nilai pKa asam sitrat masing-masing 3,13; 4,76 dan 6,4. Apabila pH lingkungan di atas nilai pKa-nya, maka proton dalam asam itu terlepas semua, sebaliknya apabila pH di bawah pKa-nya maka senyawa organik dalam bentuk asam dan tidak bermuatan (Ismail dan Hanudin 2005).

Kapasitas tukar kation maksimum logam berat tergantung pada waktu kontak dan jenis logam. Menurut Shaha dkk. (2008) kecepatan pertukaran ion logam, waktu yang diperlukan untuk pertukaran 50% logam Cd adalah 3 jam dan Pb adalah 48 menit. Menurut Sridhar dkk., (2009) waktu paruh untuk Pb setelah 20 menit dan Cd setelah 2 jam.

**Reduksi Plumbum (Pb) pada Biji Kedelai**

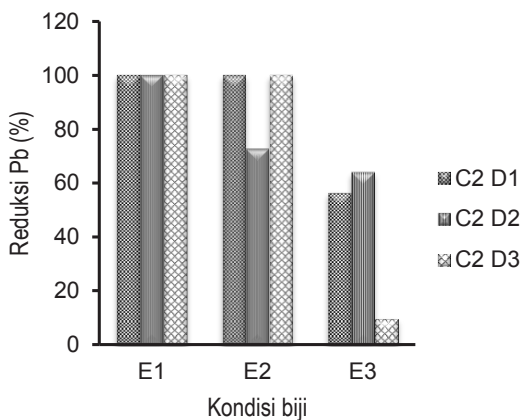
Hasil penelitian yang disajikan pada Gambar 1 dapat dinyatakan bahwa, remediasi biji kedelai (reduksi Pb) tertinggi (tidak terdeteksi – batas deteksi 0,09 ppm) terjadi pada perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Terjadi *trend* penurunan reduksi Pb seiring perubahan kondisi biji dari utuh ke kondisi tepung dan antar perlakuan menunjukkan pengaruh nyata. Hasil penelitian yang disajikan pada Gambar 2 dapat dinyatakan bahwa, remediasi biji kedelai (reduksi Pb) tertinggi (tidak terdeteksi – batas deteksi 0,09 ppm) terjadi pada perlakuan C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>. Terjadi *trend* penurunan reduksi Pb seiring perubahan kondisi biji dari utuh ke kondisi tepung dan antar perlakuan menunjukkan pengaruh nyata.



Gambar 1. Reduksi Pb (%) pada faktor perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>(1,2,3)</sub> dengan E<sub>(1,2,3)</sub>

Keterangan:

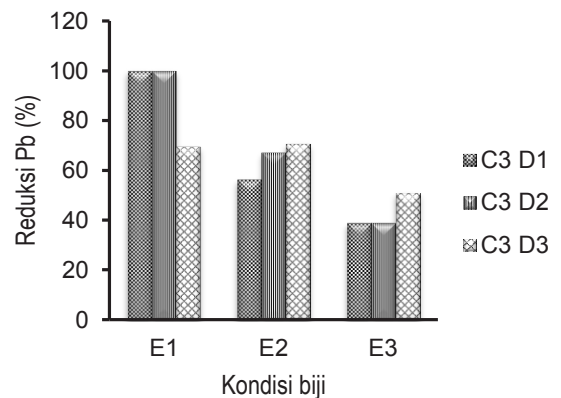
- C<sub>1</sub> ---- asam sitrat 1 gram
- D<sub>1</sub> ---- waktu kontak 90 menit
- D<sub>2</sub> ---- waktu kontak 120 menit
- D<sub>3</sub> ---- waktu kontak 180 menit
- E<sub>1</sub> ---- kondisi biji utuh (lolos pada saringan 0.3 inch dan tertahan pada 0.2 inch)
- E<sub>2</sub> ---- kondisi biji pecah (tertahan pada saringan 10 mesh)
- E<sub>3</sub> ---- kondisi biji tepung (lolos pada saringan 50 mesh)



Gambar 2. Reduksi Pb (%) pada faktor perlakuan C<sub>2</sub>D<sub>(1,2,3)</sub> dengan E<sub>(1,2,3)</sub>

Keterangan:

- C<sub>2</sub> ---- asam sitrat 2 gram
- D<sub>1</sub> ---- waktu kontak 90 menit
- D<sub>2</sub> ---- waktu kontak 120 menit
- D<sub>3</sub> ---- waktu kontak 180 menit
- E<sub>1</sub> ---- kondisi biji utuh (lolos pada saringan 0.3 inch dan tertahan pada 0.2 inch)
- E<sub>2</sub> ---- kondisi biji pecah (tertahan pada saringan 10 mesh)
- E<sub>3</sub> ---- kondisi biji tepung (lolos pada saringan 50 mesh)



Gambar 3. Reduksi Pb (%) pada faktor perlakuan C<sub>3</sub>D<sub>(1,2,3)</sub> dengan E<sub>(1,2,3)</sub>

Keterangan:

- C<sub>3</sub> ---- asam sitrat 3 gram
- D<sub>1</sub> ---- waktu kontak 90 menit
- D<sub>2</sub> ---- waktu kontak 120 menit
- D<sub>3</sub> ---- waktu kontak 180 menit
- E<sub>1</sub> ---- kondisi biji utuh (lolos pada saringan 0.3 inch dan tertahan pada 0.2 inch)
- E<sub>2</sub> ---- kondisi biji pecah (tertahan pada saringan 10 mesh)
- E<sub>3</sub> ---- kondisi biji tepung (lolos pada saringan 50 mesh)

Hasil penelitian yang disajikan pada Gambar 3 dapat dinyatakan bahwa, remediasi biji kedelai (reduksi Pb) tertinggi (tidak terdeteksi—batas deteksi 0,09 ppm) terjadi pada perlakuan C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub> dan C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>. Terjadi trend penurunan reduksi Pb seiring perubahan kondisi biji dari utuh ke kondisi tepung dan antar perlakuan menunjukkan pengaruh nyata. Kombinasi antara faktor perlakuan ratio pengkhelet "asam sitrat" (C) dengan faktor perlakuan waktu kontak (D) dan kondisi biji kedelai (E) menunjukkan berbeda nyata. Gugus fungsional asam anorganik dapat mengalami disosiasi yang melepaskan proton (H<sup>+</sup>) (Ismail dan Hanudin, 2005). Asam sitrat mempunyai tiga gugus karboksilat COOH yang dapat melepas proton (H<sup>+</sup>) dalam larutan. Ion H<sup>+</sup> pertama akan dilepas pada pH 3, H<sup>+</sup> kedua dilepas pada pH 7 dan H<sup>+</sup> ketiga dilepas pada pH 10 (Purwanto, 2012). Gugus -OH fenolat atau -OH alkohol terdisosiasi pada pH sekitar 8 - 10, dengan demikian dapat dinyatakan bahwa pada pH yang relatif tinggi akan meningkatkan konsentrasi -COO- yang dapat berfungsi sebagai ligan (Herjuna, 2011). Menurut Zander (2009) kemampuan recovery sangat tergantung pada pH. Pada pH < 5, efektivitas khelasi Cd kurang dari 20%, tetapi meningkat menjadi hampir nd = 0,09 ppm pada pH 7. Ion H ini karena ukurannya yang kecil (r = 0,3A) dan potensial ionisasinya yang besar dapat masuk ke dalam kisi-kisi kristal dan mampu menggantikan kedudukan kation penyeimbang yang ada di dalam kristal. Kereaktifan asam merupakan daya gabung dari anion organik dengan kation (Ismail dan Hanudin, 2005). Jumlah proton yang terlepas juga ditentukan oleh pH lingkungan. Pengaruh pH terhadap pelepasan proton

dapat dikaitkan dengan nilai pKa-nya. Derajat keasaman (pH) lebih besar dari 9 merupakan daerah disosiasi gugus OH fenolat (Ismail dan Hanudin, 2005). Jumlah gugus karboksil menentukan jumlah proton yang dapat dilepas, pada asam sitrat dapat melepaskan tiga proton (Ismail dan Hanudin, 2005). Berdasarkan Crystal Field Theory, interaksi antara logam transisi dan ligan diakibatkan oleh tarikan antara kation logam yang bermuatan positif dan elektron ligan yang bermuatan negatif, faktor konsentrasi dan kereaktifannya. Konsentrasi asam organik yang semakin meningkat menentukan jumlah proton yang dapat dilepas, sehingga intensitas penyerangan proton terhadap ikatan mineral juga semakin meningkat (Hongqing, 2002 dalam Khasanah, 2006).

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 2 dapat dinyatakan bahwa, remediasi biji kedelai (reduksi Pb) tertinggi (87,320%) terjadi pada perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>1</sub> kemudian secara berturut-turut diikuti C<sub>1</sub>D<sub>2</sub> (86,233%) dan C<sub>2</sub>D<sub>1</sub> (85,507%). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi pengkhelat asam sitrat 15% dengan waktu kontak 90 menit sudah mampu mereduksi sebagian besar plumbum (Pb) dan kedua faktor tersebut menunjukkan sinergisme yang baik. Asam sitrat dapat berinteraksi secara langsung dengan kelompok-kelompok hidroksil selulosa, hemiselulosa dan lignin (Hsu dkk., 2009; Mosier dkk., 2005 dalam Li dkk., 2010). Asam sitrat, tartarat dan oksalat adalah yang paling efektif untuk mengeluarkan Cd, Cu, Pb dan Zn pada berbagai nilai pH (Ullah, 2007). Asam sitrat mempunyai tiga gugus karboksilat COOH yang dapat melepas proton (H<sup>+</sup>) dalam larutan. Ion H<sup>+</sup> ketiga dilepas pada pH 10 (Purwanto, 2012), dengan demikian dapat dinyatakan bahwa pada pH yang relatif tinggi akan meningkatkan konsentrasi -COO<sup>-</sup> yang dapat berfungsi sebagai ligan (Herjuna, 2011). Kapasitas tukar kation maksimum logam berat tergantung pada waktu kontak dan jenis logam. Menurut Shaha dkk., (2008) kecepatan pertukaran ion logam, waktu yang diperlukan untuk pertukaran 50% logam Pb adalah 48 menit. Menurut Sridhar dkk. (2009) waktu paruh untuk Pb setelah 20 menit.

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 3 dapat dinyatakan bahwa, remediasi biji kedelai (reduksi Pb) tertinggi (tidak terdeteksi – batas deteksi Pb = 0,09 ppm) terjadi pada perlakuan C<sub>2</sub>E<sub>1</sub> dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan C<sub>1</sub>E<sub>1</sub> (91,667%), C<sub>2</sub>E<sub>2</sub> (90,943%), C<sub>3</sub>E<sub>1</sub> (89,857%) dan C<sub>1</sub>E<sub>2</sub> (85,143%). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi pengkhelat asam sitrat menjadi 25% dan 35% pada kondisi biji utuh dan pecah menunjukkan tidak berbeda nyata serta kedua faktor tersebut tidak saling bersinergi. Pembentukan ion kompleks adalah hasil dari daya ketertarikan kation-anion yang melebihi kompetisi antara kation dan H<sup>+</sup> untuk berbagai macam ligan (Purwanto, 2012). Jumlah maksimum ikatan antar gugus dengan kation logam ditentukan oleh bilangan koordinasinya (Ismail dan

Hanudin, 2005). Kekuatan pertukaran kation dipengaruhi oleh berbagai faktor, semakin besar muatan semakin kuat kapasitas pertukaran. Jumlah kation total yang dipertukarkan akan sebanding dengan total ion hidrogen yang dilepaskan resin (Shofyan, 2010)

Tabel 2. Reduksi Pb (%) pada kombinasi antara faktor perlakuan ratio pengkhelat "asam sitrat" (C) dengan faktor perlakuan waktu kontak (D)

Perlakuan	Reduksi Pb (%)	Notasi
C1D1	87.320	c
C1D2	86.233	bc
C2D1	85.507	bc
C2D2	78.987	abc
C2D3	69.927	abc
C3D2	68.840	ab
C3D1	65.217	a
C3D3	63.770	a
C1D3	61.593	a

Keterangan:

Perlakuan yang diikuti dengan notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Tabel 3. Reduksi Pb (%) pada kombinasi antara faktor perlakuan ratio pengkhelat "asam sitrat" (C) dengan faktor perlakuan kondisi biji (E)

Perlakuan	Reduksi Pb (%)	Notasi
C2E1	nd	d
C1E1	91.667	d
C2E2	90.943	d
C3E1	89.857	d
C1E2	85.143	d
C3E2	64.853	cd
C1E3	58.337	bc
C2E3	43.477	ab
C3E3	37.680	a

Keterangan:

- Kadar Pb pada biji kedelai (tanpa perlakuan) = 0,48 ppm
- nd ----- tidak terdeteksi (batas deteksi Pb = 0,09 ppm)
- Perlakuan yang diikuti dengan notasi yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 4 dapat dinyatakan bahwa, remediasi biji kedelai (reduksi Pb) tertinggi (tidak terdeteksi – batas deteksi Pb = 0,09 ppm) terjadi pada perlakuan D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> dan D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> tidak berbeda nyata dengan perlakuan D<sub>1</sub>E<sub>2</sub> (85,507). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa peningkatan waktu kontak dari 90 menit menjadi 120

menit pada kondisi biji utuh dan pecah menunjukkan tidak berbeda nyata. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa D<sub>1</sub>E<sub>2</sub> tidak berbeda nyata dengan D<sub>3</sub>E<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>E<sub>2</sub> dan D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa peningkatan waktu kontak dari 90 menit menjadi 120 dan 180 menit pada kondisi biji utuh dan pecah menunjukkan tidak berbeda nyata serta kedua faktor tersebut tidak saling bersinergi. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa terurainya *chelating agent* asam sitrat pada pH 10 yang dipresentasikan oleh lepasnya ion H pada gugus fungsionalnya guna mencapai kesetimbangan tidak memerlukan waktu yang lama (tidak lebih dari 90 menit), karena asam sitrat berat molekulnya rendah dan termasuk asam yang sederhana. Keadaan tersebut berbeda dengan asam humus terlihat terurai secara intens pada rentang pH rendah (pH 3) sampai pH 12. Terurainya gugus-gugus fungsional asam humus yang direpresentasikan oleh lepasnya ion-ion H<sup>+</sup> ke larutan akibat adanya reaksi asam-basa. Asam humus yang merupakan polimer dengan berat molekul yang tinggi saat bereaksi dengan NaOH diperkirakan akan melepas ion-ion H dari gugus fungsionalnya akan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menguraikan asamnya guna mencapai kesetimbangan dibandingkan dengan asam-asam sederhana (Setiawan, 2008).

Tabel 4. Reduksi Pb (%) pada kombinasi antara faktor perlakuan waktu kontak (D) dengan faktor perlakuan kondisi biji (E)

Perlakuan	Reduksi Pb (%)	Notasi
D2E1	nd	c
D1E1	nd	c
D1E2	85.507	bc
D3E1	81.523	b
D2E2	80.073	b
D3E2	75.360	b
D2E3	53.987	a
D1E3	52.537	a
D3E3	38.407	a

Keterangan:

- Kadar Pb pada biji kedelai (tanpa perlakuan) = 0,48 ppm
- nd ----- tidak terdeteksi (batas deteksi Pb = 0,09 ppm)
- Perlakuan yang diikuti dengan notasi yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi ketiga faktor (ratio asam sitrat, waktu kotak dan kondisi biji) yang disinergikan dengan DMF dan dikondisikan pada pH 10 mampu mereduksi Cd secara maksimal (tidak terdeteksi),

batas deteksi Cd = 0,01 ppm. Reduksi Pb tertinggi (tidak terdeteksi), batas deteksi Pb = 0,09 ppm; terjadi pada perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>1</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>; C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>; C<sub>3</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> dan C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>. Reduksi Pb terjadi *trend* penurunan seiring perubahan kondisi biji dari utuh ke kondisi tepung. Kombinasi antara pengkkelat "asam sitrat" (C) dengan waktu kontak (D) menunjukkan bahwa, reduksi tertinggi dicapai perlakuan C<sub>1</sub>D<sub>1</sub> (87,320 %). Kombinasi antara pengkkelat "asam sitrat" (C) dengan kondisi biji (E) menunjukkan bahwa, reduksi tertinggi dicapai perlakuan C<sub>2</sub>E<sub>1</sub> (100 % = tidak terdeteksi). Kombinasi antara waktu kontak (D) dengan kondisi biji (E) menunjukkan bahwa, reduksi tertinggi dicapai perlakuan D<sub>1</sub>E<sub>1</sub> dan D<sub>2</sub>E<sub>1</sub> (100 % = tidak terdeteksi).

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan bantuan Penelitian Hibah Bersaing dengan surat perjanjian pelaksanaan penelitian nomor : 009/006.2/PP/SP/2012.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ansari, A.R., Kazi, A.T.G., Jamali, A.M.K., Arain, A.M.B., Wagan, B.M.D., Nusrat-Jalbani C., Afridi, A.H.I. dan Shah, A.Q. (2009). Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chemistry* **115**: 318-323.
- Ariyanto, D.P. (2006). Ikatan Antara Asam Organik Tanah dengan Logam. Karya Ilmiah Pasca Sarjana Ilmu Tanah. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Association of Analytical Chemist (2005). *Official method of analysis of the association of official analytical chemist*. 17<sup>th</sup> edition Washington, D.C.
- Balia, R.L., Harlia, E., Denny dan Suryanto (2007). Keamanan pangan hasil ternak ditinjau dari cemaran logam berat. Fakultas Peternakan. Universitas Padjadjaran. *blogs.unpad.ac.id/roostitabalia/wp-content/*. [30 Januari 2010].
- Behjat, A., Dadfarnia, S., Parsaeian, M., Salmanzadeh, F., Anvari, A. M. dan Kheirkhah, M. (2009). Study of the effects of electron beam on heavy metals in presence of scavengers for decontamination and purification of the municipal and industrial wastewater. Heavy metal complexes of macrocyclic trithioethers. Physics Department, Atomic and Molecular group, Yazd

- University, Yazd, Iran; Chemistry Department, Yazd University, Yazd, Iran and Yazd Radiation Processing Center, Atomic Energy Organization, Yazd, Iran. [www-pub.iaea.org/MTCD/publications/](http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/). [3 April 2010].
- Charlena (2004). Pencemaran logam berat timbal (Pb) dan cadmium (Cd) pada sayur-sayuran. Falsafah Sain (PSL 702), Program Pascasarjana / S3 / Institut Pertanian Bogor. <http://www.scribd.com/doc/>. [30 Januari 2010].
- Drazic, G. dan Mihailovic, N. (2005). Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Science* **168**: 511-517.
- Gonzales, A.G. dan Horrador, M.A. (2007). A Practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trend in Analytical Chemistry* **26**: 227-238.
- Ismail dan Hanudin, E. (2005). Degradasi mineral batuan oleh asam-asam organik. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* **5**(1): 1-17.
- Lavado, R.S., Porcelli, C.A dan Alvarez, R. (2001). Nutrient and heavy metal concentration and distribution in corn, soybean and wheat as affected by different tillage systems in the argentine pampas. *Soil and Tillage Research* **62**: 55-60.
- Li, Q., Chai, L., Wang, Q., Yang, Z., Yan, H. dan Wang Y. (2010). Fast esterifikasi of spent grain for enhanced heavy metal ions adsorption. *Bioresource Technology* **101**: 3796-3799.
- Marwati, T., Rusli, M.S. dan Mulyono, E. (2006). Pemucatan minyak daun cengkeh dengan metode khelasi menggunakan asam sitrat. Balai besar penelitian dan pengembangan pascapanen pertanian. Departemen Teknologi Industri Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian* **17**(2): 61-68.
- Mendoza-Co'zatl, D.G., Jobe, T.O., Hauser, F. dan Schroeder, J.I. (2011). Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Plant Biology* **14**: 554-562.
- Purwanto, B.H. (2012). Interaksi antar bahan terlarut. <http://benito.staff.ugm.ac.id/>. [17 Maret 2012].
- Puslitbang Tanah (2002). Pencemaran bahan agrokimia perlu diwaspadai. Pusat penelitian Pengembangan Tanah dan Agroklimat, Bogor. [www.pustaka.litbang.deptan.go.id/](http://www.pustaka.litbang.deptan.go.id/). [23 Juni 2010].
- Setiawan, B. (2008). Peran asam humus sebagai pendesorpsi ion logam/radionuklida. Seminar Nasional IV SDM Teknologi Nuklir Yogyakarta. [jurnal.sttn-batan.ac.id/](http://jurnal.sttn-batan.ac.id/). [22 Maret 2010].
- Shaha, B.A., Shahb, A.V., Bhandaria, B.N. dan Bhatta, R.R. (2008). Synthesis, charecterization and chelation ion-exchange studies of a resin copolymer derived from 8-hydroxyquinoline-formaldehyde-catechol. *Journal Iranian Chemical Society* **5**(2): 252-261.
- Sridhar, S., Kulanthaipandi, P., Arasu, P.T., Thanikachalam, V. dan Manikandan, G. (2009). Protonating and chelating efficiencies of some biologically important thiocarbonohydrazides in 60%(v/v) ethanol-water system by potentiometric and spectrophotometric methods. *World Journal of Chemistry* **4**(2): 133-140.
- Ullah, S. (2007). *Chemically Enhanced Phytoextraction of Lead from Contaminated Soil*. Institute of Soil and Environment Sciences University of Agriculture, Faisalabad Pakistan.
- Yong, Z., Bo-Han, L., Qing-Ru, Z., Min, Z. dan Ming, L. (2008). Surfactant linear alkylbenzene sulfonate effect on soil Cd fractions and Cd distribution in soybean plant in pot experiment. *Pedosphere* **18**(2): 242-247.
- Zander, N.E. (2009). Chelating polymers and environmental remediation. *Army Research Laboratory, ARL-CR-0623*: 1-16.
- Zheljazkov, V.D., Craker, L.E. dan Xing, B. (2006). Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environmental and Experimental Botany* **58**: 9-16.
- Zheljazkova, V.D., Jeliaskova, E.A., Kovacheva, N. dan Dzhurmanski, A. (2008). Metal uptake by medicinal plant species grown in soils contaminated by a smelter. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 207-216.