

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini terdiri dari tahap preparasi, sintesis, dan karakterisasi dari CNC, film HA/PVP, dan film HA/PVP/CNC. Tahap preparasi dan sintesis dilaksanakan di Laboratorium Riset Kimia, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia. Karakterisasi film HA/PVP dan HA/PVP/CNC menggunakan FTIR-ATR, SEM, XRD, TGA, dan DSC dilakukan di Departemen Kimia, Fakultas Sains, *Kasetsart University*, Thailand. Uji tarik film HA/PVP dan HA/PVP/CNC dilakukan di Balai Besar Tekstil Bandung. Karakterisasi BC dan CNC dilakukan menggunakan (1) PSA di Laboratorium Farmasetika Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung (ITB); (2) P-FTIR dan XRD di GreenLab, Bandung; dan (3) TEM di Pusat Penelitian Nanosains dan Nanoteknologi ITB.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu gunting, blender, ayakan mesh (600 mesh), alat sentrifugasi, reaktor hidrolisis, *hot plate* dengan *magnetic stirrer*, *waterbath* dengan pemanasan, membran dialisis tipe CelluSep T4 Regenerated Cellulose Tubular Membrane MWCO 12.000-14.000, alat *ultrasonication probe* (Biobase), alat *ultrasonication bath*, indikator pH universal, gelas kimia, gelas ukur, spatula, dan batang pengaduk.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu lembaran Nata de Coco, larutan asam sulfat (Merck, p.a 98%), aquadest, serbuk HA (Cosmetic Grade; High Molecular Weight; 1500 kDa), dan serbuk PVP K-30 (Pharmaceutical Grade; 40 kDa).

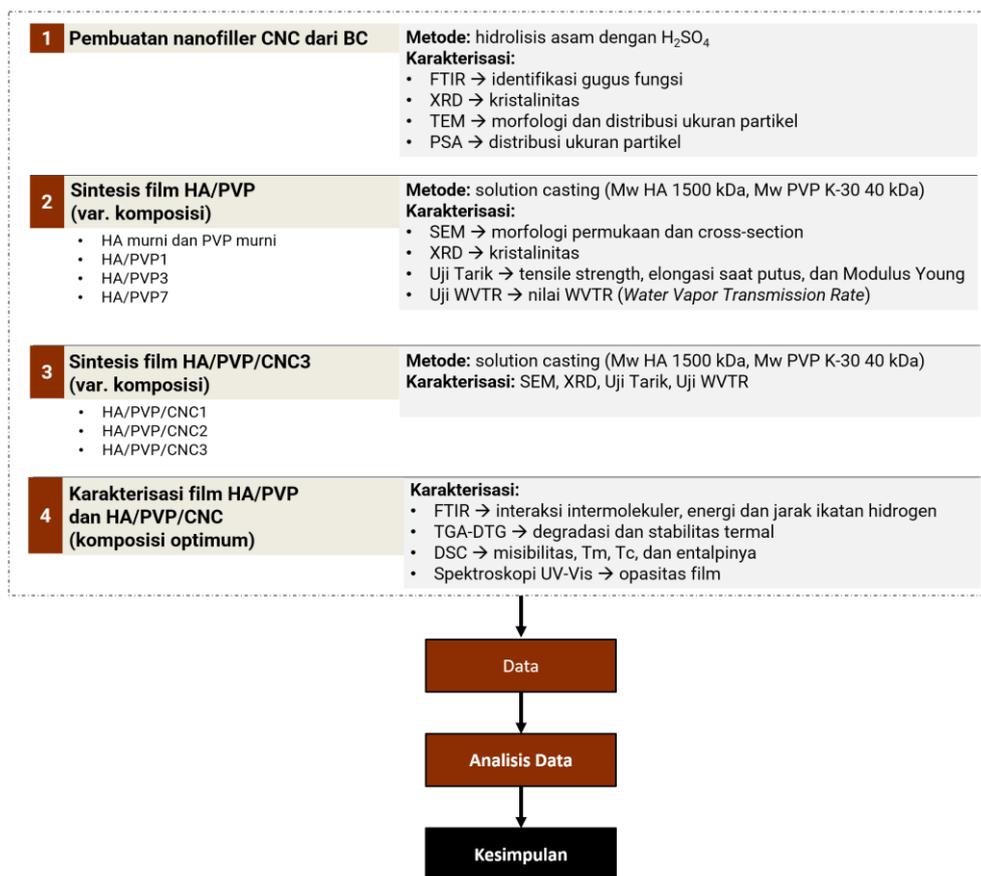
Instrumen karakterisasi untuk CNC antara lain PSA model Beckman Coulter Delsa Nano C, TEM model HT7700, FTIR model BRUKER ALPHA II, dan XRD model RIGAKU MiniFlex Benchtop Powder.

Untuk karakterisasi film HA/PVP dan HA/PVP/CNC, digunakan instrumen FTIR-ATR model The Spectrum Two PerkinElmer, SEM model FEI Quanta 450 Hillsboro, XRD model Bruker D8 Advance, TGA model Pyris 1 PerkinElmer, DSC model Pyris 1 PerkinElmer, dan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu M1240. Untuk uji mekanik film HA/PVP dan HA/PVP/CNC menggunakan uji *tensile*, instrumen yang digunakan antara lain Textechno Favigraph I-PI-067.

### 3.3 Prosedur Penelitian

Secara keseluruhan, tahap penelitian dapat dibagi menjadi empat tahap yaitu:

- (1) sintesis dan karakterisasi CNC dari BC,
  - (2) sintesis dan karakterisasi film HA/PVP dengan variasi komposisi,
  - (3) sintesis dan karakterisasi film HA/PVP/CNC dengan variasi komposisi CNC, dan (4) karakterisasi film HA/PVP dan HA/PVP/CNC dengan komposisi optimum.
- Rincian lebih detail mengenai tiap tahapan dideskripsikan pada **Gambar 3.1**.



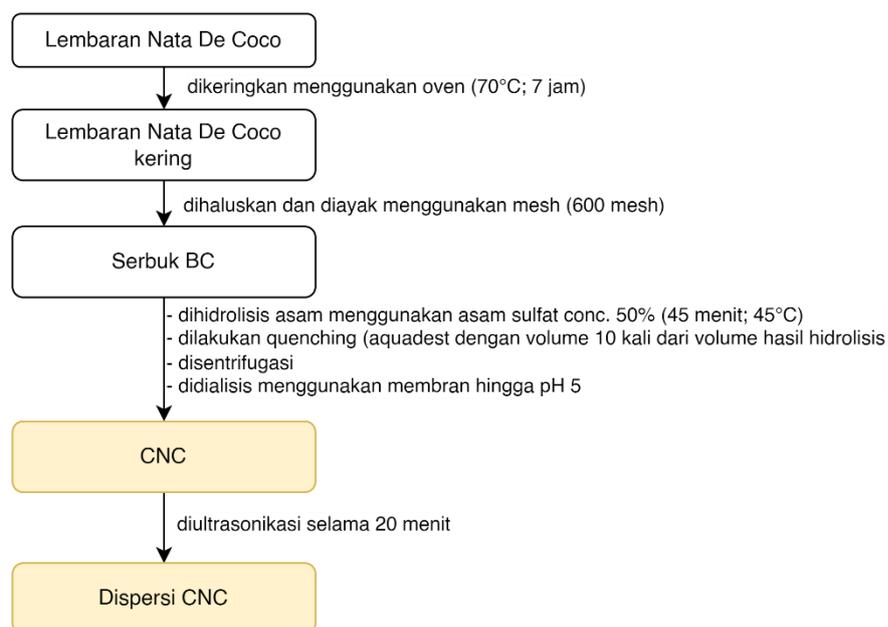
**Gambar 3.1** Tahapan penelitian

### 3.3.1 Sintesis CNC dari BC menggunakan Metode Hidrolisis Asam

**Gambar 3.2** menunjukkan prosedur sintesis CNC dari BC. Lembaran Nata de Coco dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 70°C selama 7 jam. Setelah itu, lembaran yang kering dipotong dan dihaluskan menggunakan *blender* menjadi serbuk. Serbuk BC kemudian diayak menggunakan ayakan (600 mesh) untuk memperoleh partikel BC berukuran 16 mikron. BC selanjutnya dikarakterisasi menggunakan FTIR dan XRD.

CNC diperoleh dari selulosa bakterial (BC) menggunakan metode hidrolisis asam pada kondisi optimum yang mengacu pada penelitian Anwar dkk., (2015). Pembuatan CNC dilakukan dalam beberapa tahap yaitu (1) hidrolisis asam menggunakan asam sulfat, (2) sentrifugasi, (3) dialisis, dan (4) sonikasi.

Hidrolisis BC dilakukan dengan kondisi optimum yaitu dengan merendam 1 gram selulosa bakterial (BC) dalam 50 mL asam sulfat dengan konsentrasi 50% selama 45 menit dalam kondisi temperatur 45°C. Proses hidrolisis asam dilakukan dalam reaktor hidrolisis. Setelah hidrolisis, sampel ditambahkan ke dalam aquadest dengan perbandingan volume campuran hasil hidrolisis : aquadest sebesar 1 : 10. Bagian keruh dari campuran dipisahkan dan disentrifugasi (4000 ppm, 10 menit). Sedimen kemudian didialisis dalam aquadest sampai dispersi memiliki pH~6 menggunakan kantung membran dialisis. Selanjutnya, hasil dialisis diproses menggunakan alat ultrasonikasi *probe* selama 20 menit dengan *power rate* sebesar 75%. Untuk mendapatkan serbuk nanokristal selulosa (CNC) kering, hasil ultrasonikasi dikeringkan menggunakan metode *freeze dry*. Hasil dispersi CNC dalam aquadest dikarakterisasi menggunakan PSA dan TEM, sementara serbuk CNC dikarakterisasi menggunakan FTIR dan XRD.



**Gambar 3.2** Prosedur tahap sintesis CNC dari BC

### 3.3.2 Sintesis dan Karakterisasi Film HA/PVP

Film HA/PVP dibuat dengan metode *solution casting* dengan tahapan yang ditunjukkan pada **Gambar 3.3**. Komposisi HA/PVP divariasikan dengan rasio

Gabriela Chelvina Santiuly Girsang, 2024

**PENGEMBANGAN BIOPLASTIK NANOKOMPOSIT HA/PVP/CNC UNTUK APLIKASI KEMASAN MAKANAN**

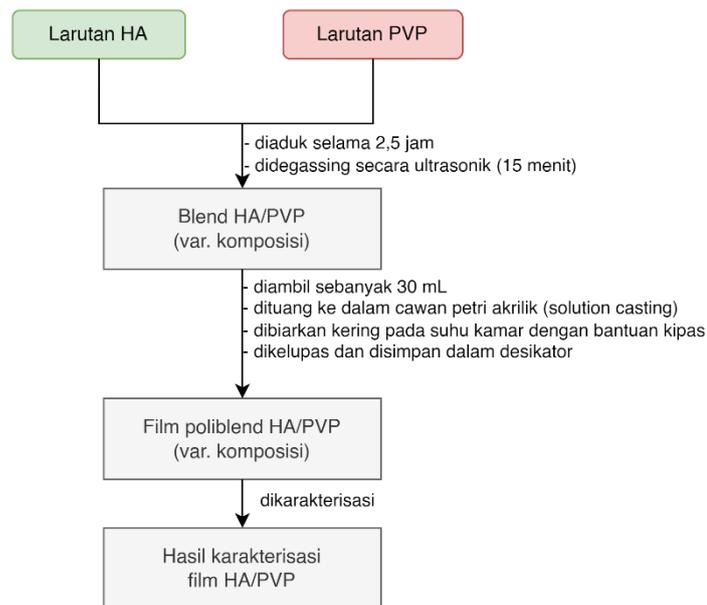
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

HA/PVP yang berbeda yaitu 1:1 ; 1:3 ; dan 1:7. **Tabel 3.1** menunjukkan komposisi serta pelabelan sampel dari film HA/PVP. Serbuk HA dilarutkan dalam 70 mL aquadest, sementara serbuk PVP dilarutkan dalam 30 mL aquadest. Larutan PVP ditambahkan ke dalam larutan HA dan diaduk tanpa pemanasan selama 2,5 jam menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan HA/PVP kemudian *didegassing* dalam alat *ultrasonication bath* selama 30 menit. Campuran HA/PVP sebanyak 30 mL dituang ke dalam cawan petri akrilik dan dibiarkan kering pada suhu kamar. Film yang sudah kering kemudian dilepaskan dari cawan petri dan disimpan dalam desikator selama 72 jam untuk menghindari kelembaban.

Film HA/PVP yang telah disintesis kemudian dikarakterisasi menggunakan uji tarik, uji laju transmisi uap air, SEM, dan XRD. Film HA/PVP dengan komposisi optimum kemudian dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan FTIR-ATR, TGA, DSC, dan spektroskopi UV-Vis. Film HA dan PVP murni disintesis dengan metode yang sama dengan pembuatan film HA/PVP.

**Tabel 3.1** Komposisi film HA, PVP, dan HA/PVP

No	Nama sampel	Rasio HA/PVP	HA (mg)	PVP (mg)	Air (mL)
1	HA/PVP1	1:1	1000	1000	100
2	HA/PVP3	1:3	500	1500	100
3	HA/PVP7	1:7	250	1750	100
4	HA	1:0	2000	-	100
5	PVP	0:1	-	2000	100



**Gambar 3.3** Prosedur tahap sintesis film HA/PVP

### 3.3.3 Sintesis dan Karakterisasi Film HA/PVP/CNC

Berdasarkan hasil temuan sifat mekanik dan morfologi, komposisi HA/PVP 1:7 dipilih sebagai komposisi optimum. Komposisi HA/PVP optimum kemudian dipakai untuk membuat film HA/PVP/CNC dengan variasi kandungan CNC yang berbeda yakni 40, 60, dan 120 mg CNC. Komposisi film HA/PVP/CNC ditunjukkan pada **Tabel 3.2**.

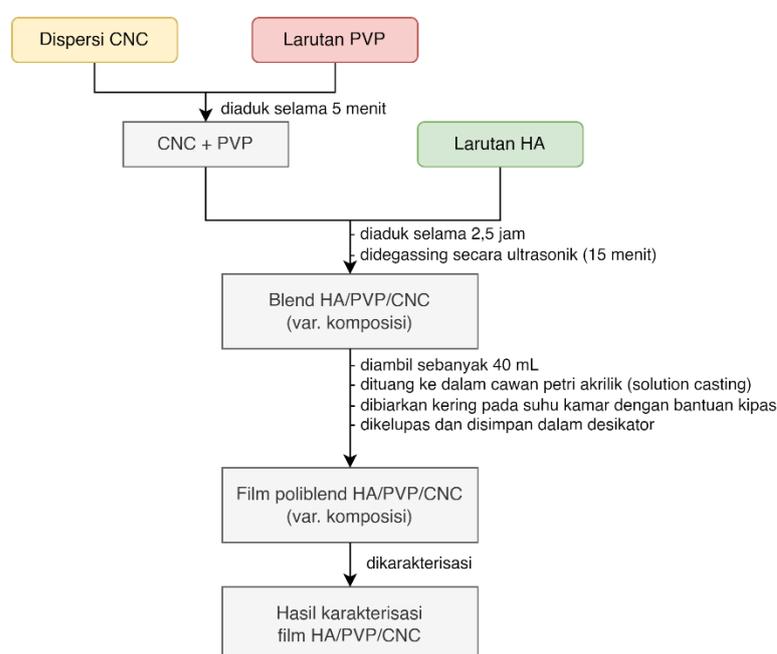
Serbuk PVP dengan jumlah tertentu dilarutkan dalam aquadest. Dispersi CNC dengan konsentrasi 50 mg/30 mL kemudian ditambahkan dalam larutan PVP, membentuk komposisi PVP/CNC yang diinginkan. Volume akhir dari campuran dispersi CNC dan larutan PVP yaitu 30 mL. Campuran PVP/CNC kemudian ditambahkan ke dalam larutan HA (70 mL) dan diaduk tanpa pemanasan selama 2,5 jam menggunakan *magnetic stirrer*.

Proses pencetakan film HA/PVP/CNC sama dengan tahap sintesis film HA/PVP. Film HA/PVP/CNC dikelupas dari cawan petri dan disimpan dalam desikator untuk menghindari kelembaban. Film HA/PVP/CNC yang telah disintesis kemudian dikarakterisasi menggunakan uji tarik, uji laju transmisi uap air, dan

XRD. Film HA/PVP/CNC dengan komposisi optimum kemudian dikarakterisasi lebih lanjut menggunakan FTIR-ATR, SEM, TGA, DSC, dan spektroskopi UV-Vis.

**Tabel 3.2** Komposisi film HA/PVP/CNC dengan variasi kandungan CNC

No	Nama sampel	HA (mg)	PVP (mg)	CNC (mg)	Air (mL)
1	HA/PVP/CNC1	250	1750	40	120
2	HA/PVP/CNC2	250	1750	60	120
3	HA/PVP/CNC3	250	1750	120	120



**Gambar 3.4** Prosedur sintesis film HA/PVP/CNC

### 3.3.4 Karakterisasi BC, CNC, Film HA/PVP, dan Film HA/PVP/CNC

#### 3.3.4.1 Spektroskopi *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) dan ATR-FTIR

Serbuk BC dan CNC dicampur dengan KBr dengan perbandingan 1:99. Campuran sampel dan KBr digerus hingga sampel dan KBr tercampur merata. Setelah penggerusan, campuran diletakkan pada cetakan pelet dan ditekan dengan penekan hidrolis hingga terbentuk pelet. Selanjutnya, pelet diletakkan dalam holder dan

dikarakterisasi dengan spektrofotometer FTIR pada bilangan gelombang 4000- 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Sampel film HA/PVP dan film HA/PVP/CNC dikarakterisasi menggunakan metode ATR-FTIR. Film dipotong dengan dimensi 0.5 mm x 0.5 mm kemudian ditaruh diatas kristal ATR. *Clamp* kemudian diatur untuk menekan sampel ke atas kristal. Pengambilan data dilakukan pada bilangan gelombang 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Identifikasi puncak dan analisis data dari spektra FTIR selanjutnya dilakukan menggunakan aplikasi OriginLab 2024. Energi ikatan hidrogen dan panjang ikatan hidrogen dihitung menggunakan Persamaan (3.1) dan Persamaan (3.2).

$$E_H = \frac{1}{k} \left[ \frac{(v_0 - v)}{v_0} \right] \quad (3.1)$$

$$\Delta v (\text{cm}^{-1}) = 4430 \times (2,84 - R) \quad (3.2)$$

dimana  $\Delta v = v_0 - v$ ,  $v_0$  adalah bilangan gelombang dari *stretching* OH monomerik ( $3600 \text{ cm}^{-1}$ ),  $v$  adalah bilangan gelombang dari *stretching* OH yang teramati pada sampel, dan  $k$  adalah konstanta dengan nilai  $1/k = 2,625 \times 10^2 \text{ kJ/mol}$ .

#### 3.3.4.2 Particle Size Analyzer (PSA)

Distribusi ukuran partikel dari suspensi CNC dalam aquadest diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* dengan metode DLS. Sebelum pengujian, CNC diultrasonikasi terlebih dahulu selama 5 menit. Suspensi CNC kemudian dimasukkan ke dalam sel atau wadah sampel PSA. Kondisi pengukuran yang digunakan antara lain suhu  $25.1^\circ\text{C}$  dengan indeks refraktif 1,3328.

#### 3.3.4.3 Transmission Electron Microscopy (TEM)

Analisis TEM dilakukan untuk mengetahui morfologi serta distribusi ukuran partikel CNC. Satu tetes suspensi CNC dideposisi pada grid mikroskop yang dilapisi oleh karbon, kemudian dikeringkan sebelum diuji TEM. Ukuran partikel dapat diperoleh secara statistik menggunakan analisis TEM dengan mengukur dimensi dari 200 partikel CNC. Pengukuran dimensi partikel CNC dilakukan menggunakan aplikasi ImageJ.

### 3.3.4.4 X-Ray Diffraction (XRD)

BC dan CNC dianalisis dalam bentuk serbuk kering sementara film HA/PVP dan HA/PVP/CNC dianalisis dalam bentuk film. Karakterisasi XRD dilakukan dengan sumber radiasi Cu K $\alpha$  dengan panjang gelombang 0.154 nm; *scan range* 2,99-90,00°; *scan step* 0.02; *generator voltage* sebesar 45 kV; *tube current* sebesar 40 mA. Pengolahan data dilakukan menggunakan aplikasi OriginLab 2024 dan Microsoft Excel. Ukuran kristalit pada semua sampel dihitung menggunakan Persamaan Scherrer:

$$D = \frac{K \lambda}{H \times \cos\theta} \quad (3.3)$$

dimana K adalah konstanta Scherrer (0.94),  $\lambda$  adalah panjang gelombang X-ray (0.154 nm), H adalah FWHM dalam unit radian, dan  $\theta$  adalah sudut Bragg. Indeks kristalinitas dari BC dan CNC dihitung menggunakan Metode Segal (Anwar dkk., 2021; Segal dkk., 1959):

$$CI (\%) = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \quad (3.4)$$

dimana  $I_{200}$  merupakan intensitas maksimum puncak difraksi kristalin pada  $2\theta$  sekitar 22.5°;  $I_{am}$  merupakan intensitas puncak difraksi amorf pada  $2\theta=18^\circ$ . Sementara, indeks kristalinitas dari film HA/PVP dan HA/PVP/CNC dihitung dari rasio luas area difraksi kristalin ( $A_c$ ) dengan total area seperti yang ditunjukkan pada Persamaan (3.5).

$$CI (\%) = \frac{A_c}{Total Area} \times 100\% \quad (3.5)$$

### 3.3.4.5 Scanning Electron Microscopy (SEM)

Analisis SEM dilakukan pada bagian permukaan dan penampang melintang film dengan tegangan 15 kV. Untuk analisa permukaan, sampel film dipotong dan direkatkan pada spesimen holder menggunakan *carbon black tape*. Untuk analisa penampang melintang, sampel film dicelupkan ke dalam nitrogen cair kemudian dipatahkan sebelum direkatkan ke *specimen holder*. Sampel yang sudah dipasang kemudian dibersihkan menggunakan *hand-blower* dan dimasukkan ke dalam mesin pelapis untuk diberi lapisan tipis berupa gold-paladium. Sampel yang telah dilapisi kemudian dimasukkan ke dalam ruang sampel. Untuk bagian permukaan film, foto

SEM diambil pada perbesaran x1000. Sementara untuk bagian cross-section, foto SEM diambil pada perbesaran x1000, x2000, x5000, dan x10000. Gambar SEM kemudian diolah lebih lanjut menggunakan aplikasi ImageJ.

#### 3.3.4.6 Thermogravimetric Analysis (TGA)

Sejumlah sampel film HA/PVP dan HA/PVP/CNC dengan massa yang sudah diukur dipanaskan dari suhu 25-600°C dengan laju pemanasan 5°C per menit pada kondisi atmosfer nitrogen. Suhu dekomposisi dan kurva DTG diperoleh pada analisis ini.

#### 3.3.4.7 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Sejumlah sampel disegel secara hermetis dalam panci DSC dan dipanaskan dari suhu 25-250°C dengan laju pemanasan 10°C per menit pada kondisi atmosfer nitrogen. Kurva DTG kemudian dianalisis dan diolah lebih lanjut menggunakan OriginLab untuk mendapatkan data  $T_g$ ,  $T_m$ ,  $T_c$ ,  $T_d$ , beserta entalpinya.

#### 3.3.4.8 Uji Tarik

Sifat mekanik film diukur menggunakan uji tarik dengan instrumen Textechno Favigraph. Sampel uji berbentuk film dipotong dengan dimensi 3 cm x 0,3 cm. Output data yang dihasilkan dari uji ini yaitu kurva *Load* (g) vs *Elongation* (%). Nilai *stress* (Pa) dapat dihitung dari nilai *Load* menggunakan Persamaan (3.6) dimana  $g$  merupakan gravitasi ( $9,807 \text{ m/s}^2$ ),  $A$  merupakan luas penampang ( $\text{m}^2$ ). Nilai *tensile strength* diperoleh dari nilai *stress* ( $\sigma$ ) tertinggi sebelum material putus. Nilai *strain* ( $\epsilon$ ) dihitung dari nilai elongasi menggunakan (3.7). Nilai Modulus Young ( $E$ ) ditentukan sebagai rasio dari nilai *stress* dan *strain* saat kurva masih berada pada daerah elastis Persamaan (3.8).

$$\text{Stress} = \frac{\text{Load (kg)} \times g}{A} \quad (3.6)$$

$$\text{Strain} = \frac{\text{Elongation (\%)}}{100} \quad (3.7)$$

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon} \quad (3.8)$$

### 3.3.4.9 Uji Laju Transmisi Uap Air (WVTR)

Uji WVTR dilakukan dengan metode yang diadaptasi dari penelitian yang dilakukan oleh Taher dkk. (2021) dengan beberapa modifikasi. Film direkatkan pada mulut vial kaca yang telah diisi silika gel seberat 5 g hingga seluruh lubang vial tertutupi. Kemudian vial dimasukkan ke dalam wadah kotak plastik dengan tutup bersegel karet yang sebelumnya telah diisi akuades. Bagian bawah vial kaca terendam air setinggi sekitar 3 cm. Wadah kotak plastik kemudian ditutup dan didiamkan selama 24 jam. Berat silika gel kemudian ditimbang kembali setelah 24 jam. Laju transmisi uap air (WVTR) diukur berdasarkan Persamaan (3.9),

$$WVTR = \frac{\Delta W}{A \times T} \quad (3.9)$$

dimana  $\Delta W$  merupakan selisih berat awal – berat akhir (g),  $A$  adalah luas permukaan film ( $m^2$ ), dan  $T$  merupakan waktu penyimpanan (hari). Perhitungan normalized-WVTR ditunjukkan pada Persamaan (3.10), dimana  $l$  adalah ketebalan film (mm)

$$Normalized WVTR = WVTR \times l \quad (3.10)$$

### 3.3.4.10 Spektroskopi UV-Visible (UV-Vis)

Sampel film berukuran 4,3 cm x 0,9 cm dimasukkan ke dalam kuvet transparan dan diukur absorbansinya menggunakan spektroskopi UV-Vis dengan udara sebagai blanko. Opasitas film diukur menggunakan Persamaan (3.11) dimana  $A$  merupakan absorbansi pada panjang gelombang 600 nm dan  $l$  adalah ketebalan film (mm).

$$Opasitas = \frac{A_{600 \text{ nm}}}{l} \quad (3.11)$$