

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

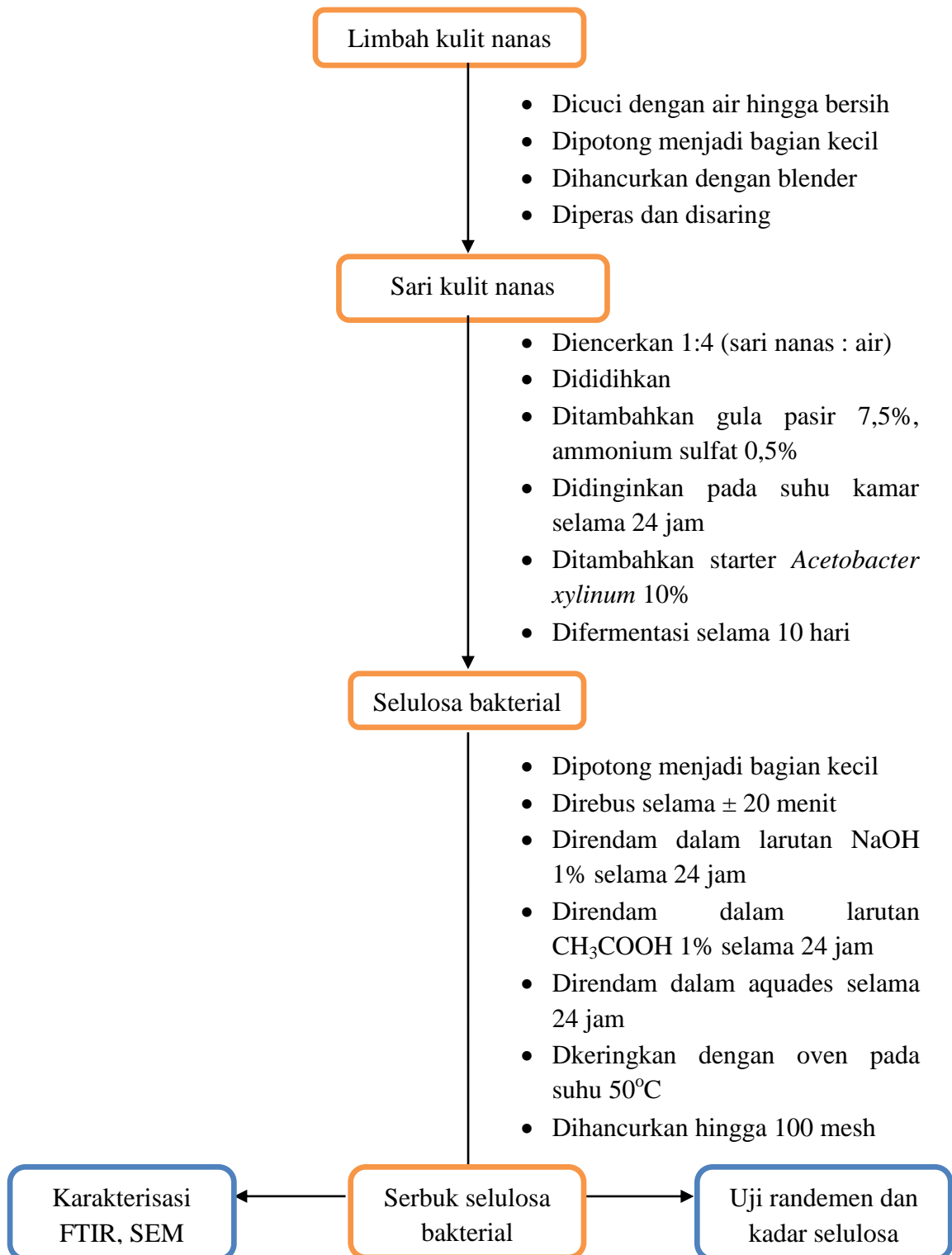
Pelaksanaan penelitian dimulai dari bulan Februari sampai Juni 2014. Sintesis selulosa bakterial dan isolasi nanokristalin selulosa bakterial dari limbah kulit nanas di Laboratorium Riset Kimia Material dan Hayati Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Pengujian *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan di Laboratorium Kimia Material Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Bandung, *X-ray Diffraction* (XRD) dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung, dan pengujian *Transmission Electron Microscopy* (TEM) dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Gajah Mada.

3.2. Desain Penelitian

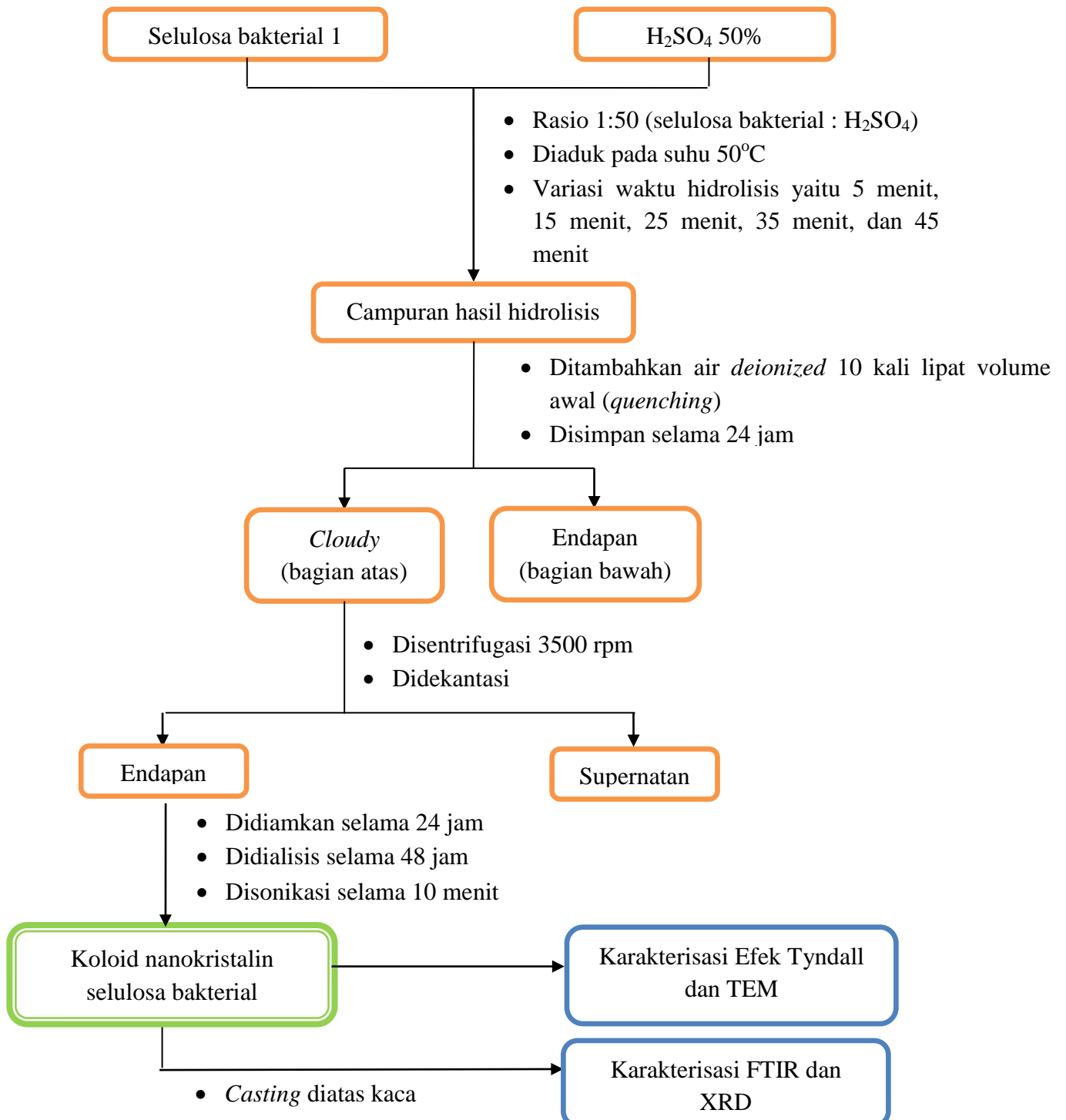
Penelitian dibagi dalam empat tahap, yaitu sintesis dan karakterisasi selulosa bakterial dari limbah kulit nanas, isolasi nanokristalin selulosa bakterial dan karakterisasi nanokristalin selulosa bakterial.

Sintesis selulosa bakterial terdiri dari pembuatan sari limbah kulit nanas, fermentasi sari limbah kulit nanas menggunakan bakteri, pemurnian selulosa bakterial limbah kulit nanas. Karakterisasi selulosa bakterial meliputi randemen dan kadar selulosa, gugus fungsi (FTIR), dan morfologi permukaan dan ukuran partikel (SEM). Isolasi nanokristalin selulosa bakterial limbah kulit nanas terdiri dari hidrolisis selulosa bakterial menggunakan asam, sentrifugasi, dialisis, dan sonikasi. Karakterisasi isolasi nanokristalin bakterial selulosa meliputi analisis gugus fungsi (FTIR), morfologi permukaan dan ukuran partikel (TEM), dan penentuan derajat kristalinitas (XRD).

Secara keseluruhan penelitian yang dilakukan berdasarkan desain pada bagan alir berikut :



Gambar 3.1. Diagram Alir Sintesis Selulosa Bakterial Limbah Kulit Nanas



Gambar 3.2. Diagam Alir Isolasi Nanokristalin Selulosa Bakterial dari Limbah Kulit Nanas

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Peralatan yang digunakan untuk tahapan preparasi selulosa bakterial dan isolasi nanokristalin selulosa bakterial dari limbah kulit nanas antara lain: pisau, blender, panci aluminium, kompor listrik, wadah plastik ukuran 30 cm x 50 cm dan tinggi 5 cm, alat-alat gelas, kaca arloji, spatula, oven, neraca analitik, saringan 100 mesh, satu set alat refluks, corong *buchner*, pengaduk magnetik, botol vial, pemanas listrik, termometer raksa, *wrapping plastic*, satu set *pompa vacuum*, satu set sentrifugator, dan satu set reaktor hidrolisis. Instrumen untuk karakterisasi digunakan FTIR, SEM, TEM dan XRD.

3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk tahapan preparasi selulosa bakterial dan isolasi nanokristalin selulosa bakterial dari limbah kulit nanas antara lain: limbah kulit nanas yang didapatkan dari pedagang di depan kampus Universitas Pendidikan Indonesia, gula pasir, amonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) (E. Merck), alkohol 95%, NaOH 1% (E. Merck), CH₃COOH glasial (E. Merck), H₂SO₄ 97% (E. Merck), biakan bakteri *Acetobacter xylinum*, kertas saring *whatmann*, pH *indicator*, air, aquades, air *deionized* (E. Merck), dan membran semipermeabel (Cellu-Sep®; MWCO 12,000-14,000. *Membrane Filtration Products*, Inc. TXS, USA).

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Sintesis Selulosa Bakterial dari Limbah Kulit Nanas

Sintesis selulosa bakterial terdiri dari beberapa tahap diantaranya: pembuatan sari limbah kulit nanas, fermentasi dengan bakteri, serta pemurnian selulosa bakterial limbah kulit nanas.

3.4.1.1. Pembuatan Sari Limbah Kulit Nanas

Sebanyak 5 kg limbah kulit nanas dicuci menggunakan air bersih, dipotong menjadi bagian kecil, diblender, dan disaring menggunakan kain hingga diperoleh sari limbah kulit nanas.

3.4.1.2. Fermentasi Sari Limbah Kulit Nanas Menggunakan Bakteri (Susanto, et.al 2000)

Sari limbah kulit nanas yang diperoleh sebanyak 5 liter. Diencerkan hingga perbandingan sari kulit nanas: air (1:4). Larutan direbus sampai mendidih, kemudian ditambahkan gula pasir 7,5% (b/v) dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% (b/v). Larutan medium nata ini dimasukkan ke dalam wadah plastik berukuran 30 cm x 50 cm dan tinggi 5 cm yang telah disterilkan terlebih dahulu dengan alkohol dan sinar UV. Larutan medium nata ini segera ditutup menggunakan koran yang telah disterilkan dan diikat dengan karet, kemudian disimpan selama 24 jam pada suhu ruangan dan ditambahkan starter *Acetobacter xylinum* sebanyak 10% (v/v) kedalam medium nata yang benar-benar telah dingin. Bakteri dibiarkan berfermentasi selama 10 hari.

3.4.1.3. Pemurnian Selulosa Bakterial dari Limbah Kulit Nanas (Safriani, 2000)

Selulosa bakterial dipotong-potong menjadi bagian kecil kemudian direbus selama ± 20 menit. Selulosa bakterial yang telah direbus kemudian direndam dalam larutan NaOH 1% (v/v) selama 24 jam. Setelah itu, direndam kembali menggunakan larutan CH_3COOH 1% (v/v) selama 24 jam pada suhu ruangan, dan aquades selama 24 jam. Setelah proses perendaman selesai selulosa bakterial disaring menggunakan *vacuum evaporator* untuk menghilangkan air hingga diperoleh lembaran selulosa bakterial yang tipis. Lembaran tipis tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C dan dihancurkan dengan blender, dan disaring dengan saringan 100 mesh hingga didapatkan serbuk selulosa bakterial.

3.4.2. Karakterisasi Selulosa Bakterial dari Limbah Kulit Nanas

3.4.2.1. Randemen

Randemen selulosa bakterial yang dihasilkan terhadap 5 kg kulit nanas dihitung dengan cara menimbang serbuk selulosa kering. Persen randemen yang diperoleh dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Randemen selulosa bakterial} = \frac{\text{Massa selulosa bakterial}}{\text{Massa limbah kulit nanas}} \times 100\%$$

3.4.2.2. Analisis Gugus Fungsi Menggunakan FTIR

Sampel selulosa bakterial yang dihasilkan dilakukan identifikasi gugus fungsi menggunakan instrumen FTIR. Sampel berbentuk padatan dibuat pelet. Pelet KBr dibuat dengan menggerus sampel dan kristal KBr (0.1-2.0 % berdasar berat) sehingga merata kemudian ditekan (hingga 8 ton) sampai diperoleh pelet. Pelet siap untuk dianalisis.

3.4.2.3. Kadar Selulosa (Chesson A, 1981)

Disiapkan satu gram selulosa kering (Berat A) ditambahkan aquades 150 mL, direfluks pada suhu 100°C selama satu jam. Hasil refluks disaring menggunakan pompa *vacuum* dan dicuci menggunakan air panas 300 mL, dikeringkan menggunakan oven hingga diperoleh berat konstan (Berat B). Residu B ditambahkan H₂SO₄ 1N sebanyak 150 mL direfluks selama satu jam pada suhu 100°C. Hasil refluks disaring menggunakan pompa *vacuum* dan dicuci menggunakan aquades hingga diperoleh pH netral, kemudian dikeringkan menggunakan oven hingga diperoleh berat konstan (Berat C). Residu C yang diperoleh ditambahkan H₂SO₄ 72% sebanyak 100 mL dan direndam pada suhu ruangan selama 4 jam. Selanjutnya residu ditambahkan H₂SO₄ 1N sebanyak 150 mL selama satu jam. Hasil refluks disaring menggunakan pompa *vacuum* dan dicuci menggunakan aquades hingga diperoleh pH netral, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 60°C hingga diperoleh berat konstan (Berat D). Kadar selulosa yang dihasilkan dihitung menggunakan persamaan berikut :

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{\text{Berat C} - \text{Berat D}}{\text{Berat A}} \times 100\%$$

3.4.2.4. Analisis Morfologi Permukaan Menggunakan SEM

Sampel yang akan dipelajari dan akan diambil gambarnya dengan SEM harus bersifat konduktif, dan arena pengoperasian SEM berlangsung dalam *vacuum* maka sampel harus bebas air dan lemak. Untuk sampel yang tidak konduktif, sampel harus di *sputtering* (dilapisi secara tipis) dengan Au atau Pt.

Prosedur *sputtering* sampel nonkonduktif ini adalah sebagai berikut: Sampel dibersihkan, dikeringkan dengan *vacuum* hingga bebas H₂O, dan sampel ditempatkan pada sampel holder. Ukuran sampel holder adalah 12 mm atau 25 mm. Diperlukan *double-side tape* konduktif untuk menempelkan sampel dengan area sudut 45 derajat.

3.4.3. Isolasi Nanokristalin Bakterial Selulosa dari Limbah Kulit Nanas

Proses isolasi nanokristalin bakterial selulosa terdiri dari beberapa tahap diantaranya: proses hidrolisis menggunakan asam kuat H₂SO₄, sentrifugasi, dialisis, sonikasi, dan penentuan kondisi optimum

3.4.3.1. Hidrolisis Selulosa Bakterial Menggunakan Asam

Larutan H₂SO₄ 50% dimasukan 50 mL kedalam reaktor, diaduk hingga campuran reaktor homogen pada suhu 50°C. Kemudian ditambahkan 1 gram serbuk selulosa hingga perbandingan selulosa bakterial/asam (1:50). Hasil hidrolisis dilakukan *quenching* menggunakan air *deionized* 500 mL dan disimpan dalam lemari pendingin selama 24 jam.

3.4.3.2. Proses Sentrifugasi

Hasil *quenching* terbentuk dua bagian yaitu *cloudy* (bagian atas) dan endapan (bagian bawah). *Cloudy* yang dihasilkan dipisahkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm hingga diperoleh endapan. Endapan dicuci dengan aquades ditampung ke dalam gelas kimia.

3.4.3.3. Dialisis

Endapan yang telah disentrifugasi dibiarkan selama 24 jam. Endapan yang diperoleh didekantasi dan dimasukan ke dalam membran dialisis yang berisi air *deionized*. Proses dialisis dilakukan selama 48 jam pada suhu ruangan.

3.4.3.4. Sonikasi

Endapan hasil dialisis kemudian disonikasi selama 10 menit. Sonikasi dilakukan hingga diperoleh koloid nanokristalin selulosa bakterial.

3.4.3.5. Penentuan Kondisi Optimum

Penelitian isolasi nanokristalin selulosa bakterial dilakukan variasi waktu hidrolisis. Variasi waktu hidrolisis yaitu 5 menit, 15 menit, 25 menit, 35 menit, dan 45 menit.

3.4.4. Karakterisasi Nanokristalin Selulosa Bakterial dari Limbah Kulit Nanas

3.4.4.1. Analisis Gugus Fungsi Menggunakan FTIR

Sampel nanokristalin selulosa bakterial yang dihasilkan dilakukan identifikasi gugus fungsi menggunakan instrumen FTIR. Sampel nanokristalin di-*casting* di atas kaca sehingga diperoleh serbuk nanokristalin selulosa bakterial. Sampel berbentuk padatan dibuat pelet. Pelet KBr dibuat dengan menggerus sampel dan kristal KBr (0.1 - 2.0 % berdasar berat) sehingga merata kemudian ditekan (hingga 8 ton) sampai diperoleh pelet. Pelet siap untuk dianalisis.

3.4.4.2. Efek Tyndall

Sejumlah sampel koloid nanokristalin selulosa bakterial disimpan di tempat gelap, kemudian sampel disinari menggunakan laser dalam beberapa detik hingga terlihat adanya hamburan cahaya dari sampel koloid nanokristalin selulosa bakterial tersebut.

3.4.4.3. Analisis Morfologi Permukaan dan Ukuran Partikel dengan TEM

Morfologi permukaan dan bentuk nanokristalin selulosa bakterial dianalisis menggunakan TEM. Sampel yang akan dianalisis dan akan diambil gambarnya menggunakan TEM harus bersifat konduktif, dan arena pengoperasian TEM berlangsung dalam vakum maka sampel harus bebas air dan lemak. Untuk sampel yang tidak konduktif, sampel harus di *sputtering* (dilapisi secara tipis) dengan Au atau Pt. Prosedur *sputtering* sampel non konduktif ini adalah sebagai berikut: Sampel dibersihkan, dikeringkan dengan vakum hingga bebas H₂O, dan sampel ditempatkan pada sampel holder. Ukuran sampel holder adalah 12 mm atau 25 mm. Diperlukan *double-side tape* konduktif untuk menempelkan sampel dengan area sudut 45 derajat.

3.4.4.4. Analisis Penentuan Derajat Kristalinitas Menggunakan XRD

Derajat kristalinitas dari nanokristalin selulosa bakterial dapat diketahui dari hasil pengukuran menggunakan XRD. Sampel yang sudah terbebas dari pengotor yang tidak diinginkan disiapkan, kemudian sampel dihaluskan. Sampel yang telah dihaluskan diletakan pada sampel holder secara merata dengan permukaan yang mendatar. Sampel holder telah siap untuk dianalisis.