

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai sejak Februari sampai Juni 2014. Sintesis selulosa bakterial dan isolasi nanokristalin selulosa bakterial dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Material dan Kimia Hayati Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Analisis dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR), *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan *X-ray Diffraction* (XRD) dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Teknik Kimia Institut Teknologi Bandung, sedangkan analisis dengan *Transmission Electron Microscope* (TEM) dilakukan di Laboratorium Kimia Universitas Gajah Mada.

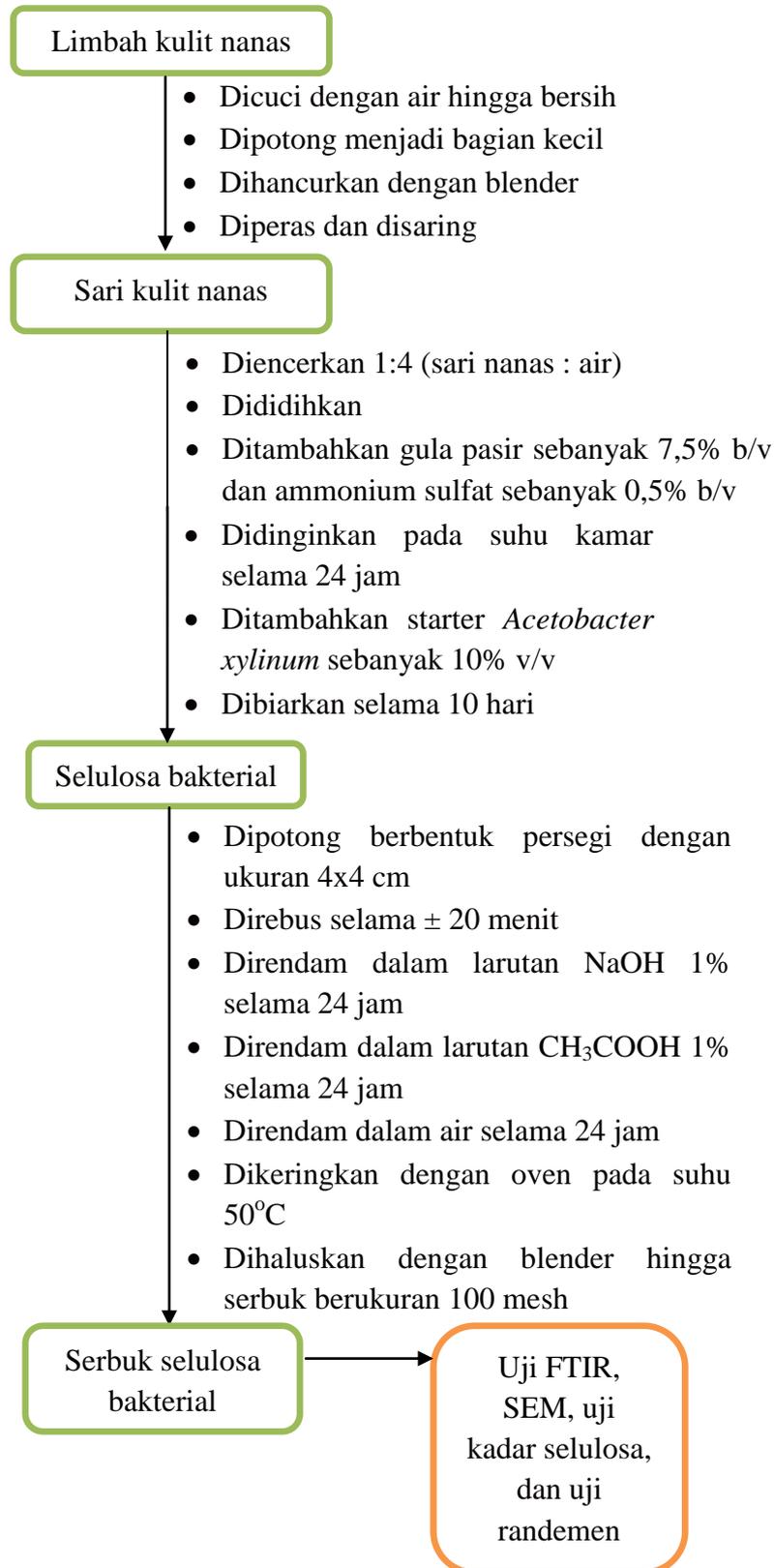
3.2. Rancangan Penelitian

Secara garis besar, rancangan penelitian ini dibagi menjadi empat tahap yaitu sintesis selulosa bakterial, karakterisasi selulosa bakterial, isolasi nanokristalin selulosa bakterial dengan metode hidrolisis asam dan karakterisasi nanokristalin selulosa bakterial. Secara keseluruhan, prosedur penelitian ini dapat digambarkan dalam bentuk bagan seperti pada **Gambar 3.1** dan **Gambar 3.2**.

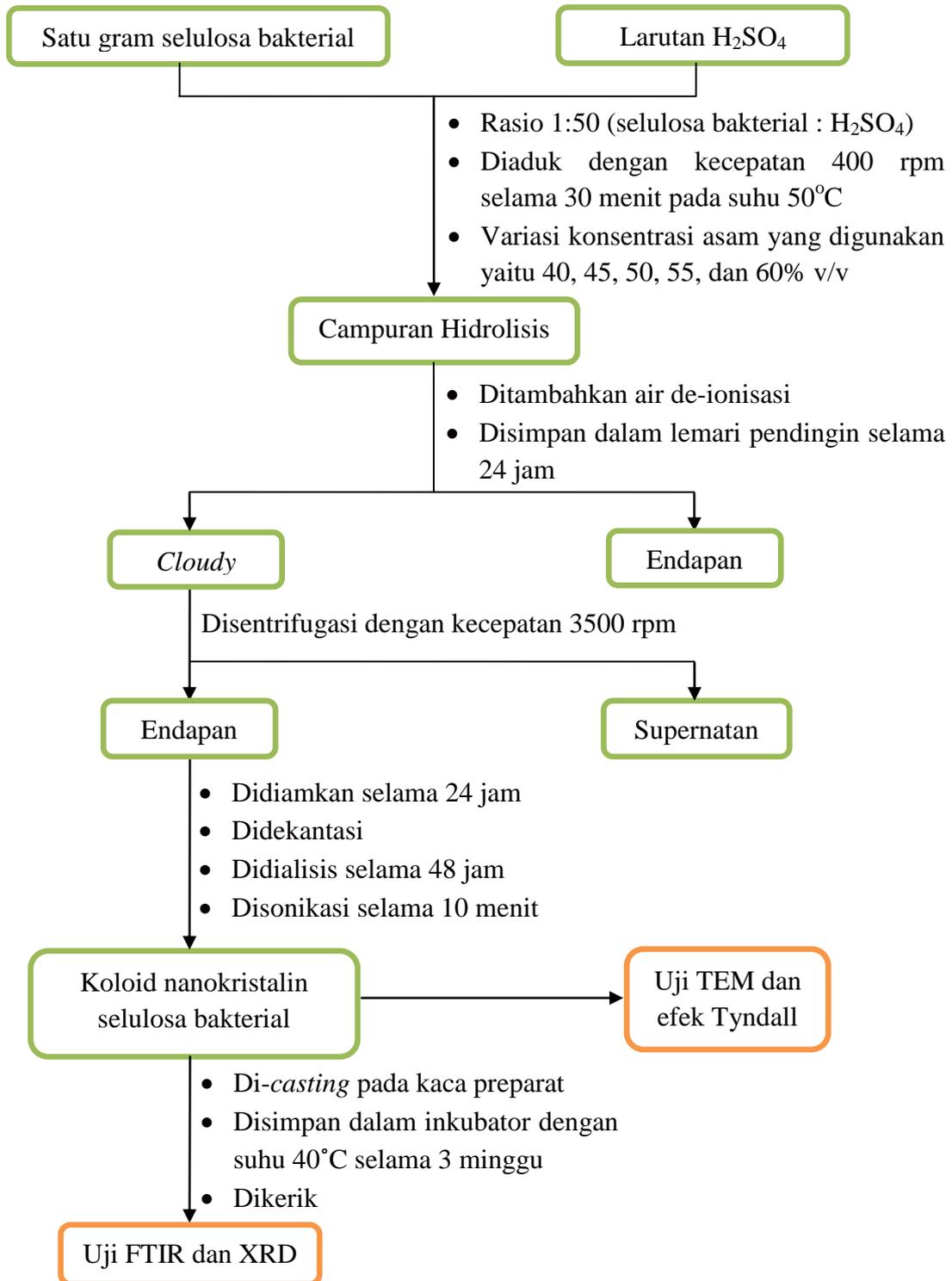
3.2.1. Alat, Bahan, dan Karakterisasi

3.2.1.1. Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: alat-alat gelas, blender, kompor listrik, panci, wadah plastik, set alat refluks, corong Buchner, termometer raksa, *magnetic stirrer*, *hotplate*, *waterbath*, pompa vakum, neraca analitik, oven, botol vial, plastik *wrap*, set reaktor hidrolisis, alat sentrifugasi, alat sonikasi, dan inkubator.



Gambar 3.1. Bagan alir sintesis selulosa bakterial



Gambar 3.2. Bagan alir isolasi nanokristalin selulosa bakterial

3.2.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: limbah kulit nanas, air, starter bakteri *Acetobacter xylinum*, ZA teknis, gula pasir Gulaku, alkohol 95%, aquades, asam asetat glasial (E.merck), natrium hidroksida teknis, asam sulfat 97% (E.merck), air de-ionisasi, indikator pH universal, kertas saring, dan membran semipermeabel Cellu-Sep®; MWCO 12,000-14,000 (Membrane Filtration Products, Inc. TXS, USA).

3.2.1.3. Karakterisasi

Alat-alat yang digunakan untuk karakterisasi adalah instrumen FTIR (Shimadzu, FTIR-8400), XRD (X'Pert Philips Analytical), TEM (JEOL JEM-1400), dan SEM (JEOL JSM-6510LV).

3.2.2. Prosedur Penelitian

3.2.2.1. Sintesis Selulosa Bakterial

Sintesis selulosa bakterial terdiri dari beberapa tahap, yaitu : preparasi sari limbah kulit nanas, fermentasi dengan bakteri *Acetobacter xylinum*, dan pemurnian selulosa bakterial.

i. Preparasi sari limbah kulit nanas

Limbah kulit nanas sebanyak lima kg baik dalam keadaan segar maupun busuk. Kulit nanas dicuci terlebih dahulu, kemudian dihaluskan menggunakan blender dan disaring menggunakan kain. Selanjutnya sari kulit nanas diencerkan dengan perbandingan 1 : 4.

ii. Fermentasi dengan bakteri *Acetobacter xylinum*

Sari kulit nanas yang telah diencerkan kemudian dipanaskan hingga mendidih, lalu ditambahkan gula sebanyak 7,5% b/v dan ZA sebanyak 0,5% b/v. Setelah campuran mendidih, dibiarkan selama satu malam pada suhu ruangan. Starter bakteri *Acetobacter xylinum* sebanyak 10% v/v dimasukkan ke dalam campuran sari nanas lalu dibiarkan selama 10 hari.

iii. Pemurnian selulosa bakterial (Safriani, 2000)

Nata yang diperoleh dipotong-potong dan dipanaskan dengan air hingga mendidih lalu ditambahkan larutan NaOH 0,2 M sebanyak 1% v/v dan direndam selama satu hari. Selanjutnya nata direndam dengan CH₃COOH glasial 1% v/v dan air secara berturut-turut masing-masing selama satu hari. Nata yang telah bersih kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 50°C kemudian dihaluskan menggunakan blender dan serbuk selulosa bakterial yang diperoleh disaring menggunakan saringan 100 mesh.

3.2.2.2. Karakterisasi Selulosa Bakterial

Karakterisasi selulosa bakterial dari limbah kulit nanas dibatasi pada randemen, gugus fungsi, kadar selulosa, dan morfologi permukaan. Gugus fungsi selulosa bakterial dianalisis menggunakan FTIR dan morfologi permukaan selulosa bakterial dianalisis menggunakan SEM.

i. Uji Randemen

Randemen selulosa bakterial terhadap limbah kulit nanas dihitung dari massa (g) serbuk selulosa bakterial yang dihasilkan terhadap limbah kulit nanas sebelum dihaluskan, menggunakan rumus pada **persamaan (3.1)** :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{massa serbuk selulosa bakterial}}{\text{massa limbah kulit nanas}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

ii. Analisis Gugus Fungsi Menggunakan FTIR

Untuk sampel serbuk selulosa bakterial, sebelum pengujian dilakukan pembentukan pelet dengan mencampurkan 0,1 g serbuk KBr dan sampel sebanyak ± 1% dari berat KBr dalam mortal agate sehingga merata. Cetakan pelet kemudian dicuci dengan kloroform, selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam set cetakan. Proses pencetakan dilakukan menggunakan pompa hidrolik hingga tekanan ± 80 bar.

iii. Uji Kadar Selulosa (Chesson, A., 1981)

Satu gram selulosa kering (berat A) ditambahkan aquades sebanyak 150 mL lalu direfluks pada suhu 100°C selama satu jam, dengan set alat seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 3.3**. Hasil refluks disaring menggunakan pompa vakum dan dicuci menggunakan air panas sebanyak 300 mL, selanjutnya dikeringkan menggunakan oven hingga diperoleh berat konstan (berat B). Residu B ditambahkan H₂SO₄ 1N sebanyak 150 mL dan direfluks selama satu jam pada suhu 100°C. Hasil refluks disaring menggunakan pompa vakum dan dicuci menggunakan aquades hingga 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 kamar selama 4 jam. Selanjutnya residu ditambahkan H₂SO₄ 1N sebanyak 150 mL dan direfluks selama satu jam. Hasil refluks disaring menggunakan pompa vakum dan dicuci menggunakan aquades hingga pH netral, kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105°C hingga diperoleh berat konstan (Berat D).

Kemudian dihitung dengan rumus pada **persamaan (3.2)** :

$$\text{Kadar selulosa} = \frac{\text{berat C}-\text{berat D}}{\text{berat A}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(3.2)$$

iv. Analisis Morfologi Permukaan Menggunakan SEM

Sampel yang bersifat tidak konduktif seperti lembaran nata kering, harus di-*sputtering* terlebih dahulu. Pertama, sampel dibersihkan dan dikeringkan dengan vakum. Selanjutnya sampel ditempatkan pada sampel holder dengan ukuran 12 mm atau 25 mm dengan kemiringan 45°. Sampel ditempelkan menggunakan *double-sided tape conductive*. Kemudian dilakukan pelapisan sampel dengan Au atau Pt.

3.2.2.3. Isolasi Nanokristalin Selulosa Bakterial

Isolasi nanokristalin selulosa bakterial terdiri dari beberapa tahap, yaitu : hidrolisis, sentrifugasi, dialisis, sonikasi, dan *casting*.



Gambar 3.3. Uji kadar selulosa

i. Hidrolisis

H_2SO_4 pekat sebanyak 50 mL dimasukkan ke dalam reaktor, diaduk dengan *stirrer* hingga suhu homogen pada 50°C seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 3.4**. Kemudian ditambahkan satu gram serbuk selulosa sehingga perbandingan antara selulosa bakterial dengan H_2SO_4 adalah 1:50 selanjutnya diaduk dengan kecepatan 400 rpm selama 30 menit. Pada proses hidrolisis digunakan variasi variabel konsentrasi asam sulfat yaitu 40%, 45%, 50%, 55% dan 60% v/v.

ii. Sentrifugasi

Hasil dari hidrolisis kemudian di-*quenching* menggunakan air de-ionisasi sebanyak 500 mL dan disimpan dalam lemari pendingin selama 24 jam. Dari hasil *quenching* kemudian diambil bagian *cloudy*, yang berupa padatan yang mengapung di bagian atas campuran, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 30 menit hingga diperoleh endapan. Endapan yang diperoleh ditampung ke dalam gelas kimia.

iii. Dialisis

Hasil sentrifugasi dibiarkan selama 24 jam, kemudian dilakukan proses dekantasi dan suspensi yang diperoleh dimasukkan ke dalam membran semipermeabel. Membran berisi suspensi tersebut direndam dalam gelas kimia yang berisi air de-ionisasi. Proses dialisis dilakukan selama 48 jam pada suhu kamar.



Gambar 3.4. Hidrolisis selulosa bakterial

iv. Sonikasi

Hasil dari proses dialisis kemudian disonikasi selama 10 menit hingga diperoleh nanokristalin selulosa bakterial yang berbentuk koloid.

v. Casting

Nanokristalin selulosa bakterial yang diperoleh di-casting untuk keperluan karakterisasi menggunakan FTIR dan XRD. Sampel diteteskan pada kaca preparat kemudian disimpan di dalam inkubator dengan suhu 40°C selama 3 minggu. Selanjutnya, sampel yang telah kering dikerik hingga diperoleh nanokristalin selulosa bakterial dalam bentuk serbuk.

3.2.2.4. Karakterisasi Nanokristalin Selulosa Bakterial

Karakterisasi nanokristalin selulosa bakterial dibatasi pada gugus fungsi, morfologi dan ukuran partikel, serta derajat kristalinitas. Gugus fungsi nanokristalin selulosa bakterial dianalisis menggunakan FTIR, morfologi dan ukuran partikel dianalisis secara kualitatif melalui percobaan efek tyndall dan didukung menggunakan TEM, serta derajat kristalinitas ditentukan menggunakan XRD.

i. Analisis Gugus Fungsi Menggunakan FTIR

Untuk sampel serbuk nanokristalin selulosa bakterial, sebelum pengujian dilakukan pembentukan pelet dengan mencampurkan 0,1 g serbuk KBr dan sampel sebanyak $\pm 1\%$ dari berat KBr dalam mortal agate sehingga merata.

Cetakan pelet kemudian dicuci dengan kloroform, selanjutnya campuran dimasukkan ke dalam set cetakan. Proses pencetakan dilakukan menggunakan pompa hidrolik hingga tekanan ± 80 bar.

ii. Percobaan Efek Tyndall

Efek tyndall adalah efek yang terjadi jika suatu koloid terkena suatu berkas cahaya. Pada saat larutan sejati disinari dengan cahaya, maka larutan tersebut tidak akan menghamburkan cahaya, sedangkan pada sistem koloid, cahaya akan dihamburkan. Uji kualitatif ini dilakukan dengan cara menyinari koloid nanokristalin selulosa bakterial dengan seberkas cahaya di tempat gelap.

iii. Analisis Morfologi dan Ukuran Partikel Menggunakan TEM

Sampel yang bersifat tidak konduktif seperti koloid nanokristalin selulosa bakterial, harus di-*sputtering* terlebih dahulu. Sampel ditempatkan pada sampel holder dengan ukuran 12 mm atau 25 mm kemudian dikeringkan dengan vakum. Kemudian dilakukan pelapisan sampel dengan Au atau Pt.

iv. Penentuan Derajat Kristalinitas Menggunakan XRD

Untuk sampel serbuk nanokristalin selulosa bakterial, dilakukan pembentukan pelet dengan tekanan tinggi ataupun dengan menambahkan zat pengikat seperti wax dan etil selulosa. Selanjutnya, pelet yang telah terbentuk diletakkan pada sampel holder yang ada pada XRD untuk diuji.