

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap diantaranya adalah sintesis, uji aktivitas antibakteri, dan karakterisasi. Sintesis membran dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia (uji cincin inhibisi) dan Balai Kesehatan Lingkungan, Bandung (uji *Total Plate Counting* (TPC)). Sedangkan tahap karakterisasi membran yaitu; Uji FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen, FPMIPA A Universitas Pendidikan Indonesia, uji XRD dilakukan di Laboratorium *Plasticity Control and Mechanical Modelling*, Universitas Yeungnam, Korea, sedangkan uji kekuatan mekanik dilakukan di Balai Besar Tekstil, Bandung. Penelitian dimulai pada bulan Mei 2016 sampai Oktober 2016.

3.2. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan adalah Kitosan (DD 87,5%), Polietilen Glikol 6000 (PEG 6000), Natrium Hidroksida (NaOH), Asam asetat 98%, Akuades, *Graphene Oxide suspended* (GO) (metode *Hummer*), *Multiwall Carbon Nanotubes* (MWCNT) dengan metode *Chemical Vapor Deposition* (CVD), menghasilkan MWCNT~100 nm *bundle*. Fungsionalisasi MWCNT menggunakan asam kuat (H_2SO_4 dan HNO_3). GO dan MWCNT didapat dari Wako *Chemical*, Japan.

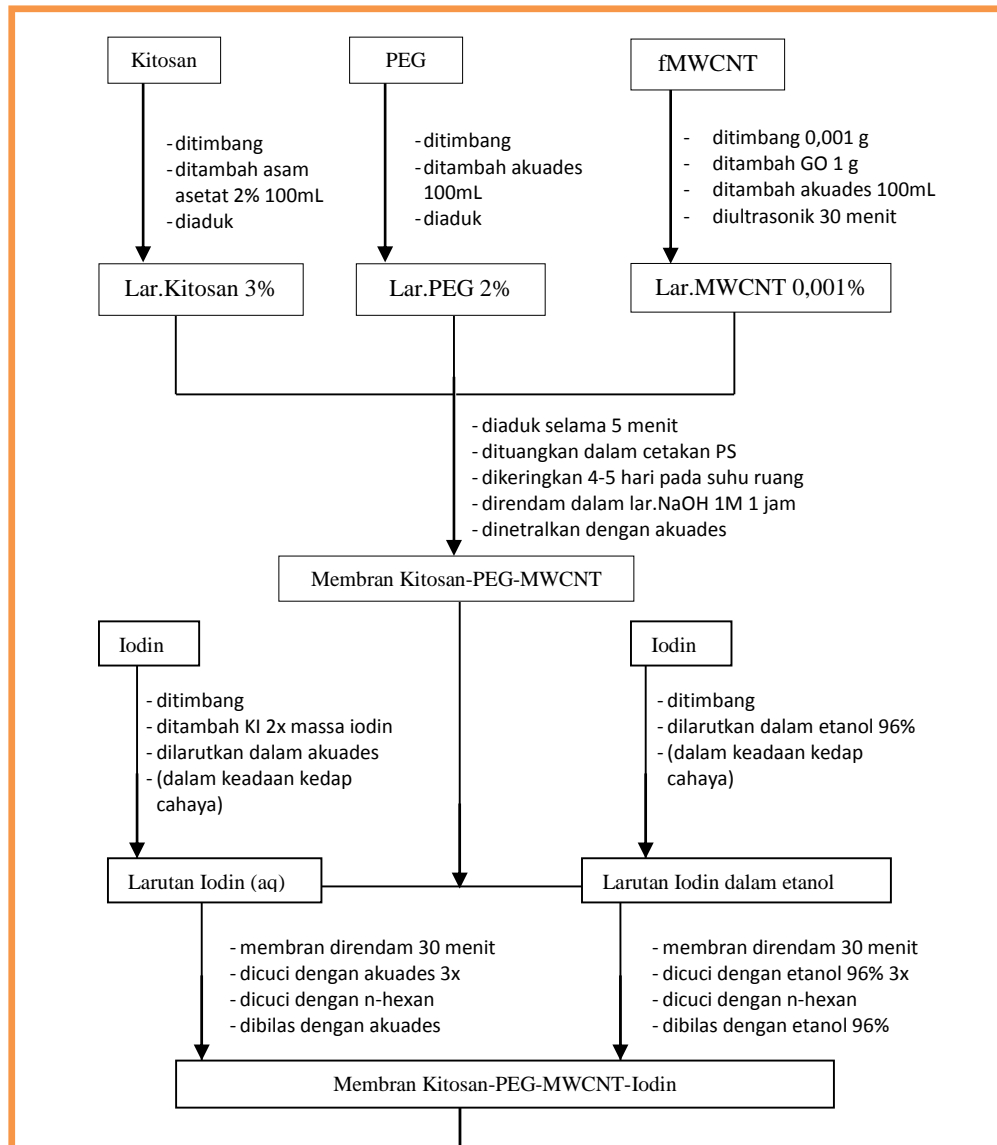
Alat-alat yang digunakan pada tahap sintesis berupa alat-alat gelas standar meliputi gelas kimia 100 mL, 250 mL, 400 mL, gelas ukur 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, kaca arloji, batang pengaduk, spatula, botol semprot, *magnetic stirrer*, pipet ukur 2 mL, 5 mL, 10 mL, *magnetic bar*, pengaduk mekanik, ultrasonik, neraca analitis, alat pencetak membran (PS/Steroform). Sedangkan untuk karakterisasi membran digunakan beberapa instrumentasi yaitu Shimadzu *Fourier Transform Infrared* (FTIR), Rigaku D/Max-2200 *X-ray Diffraction* (XRD)

dengan sumber sinar-X Cu K alpha, dan Textechno 41066 untuk uji kekuatan mekanik.

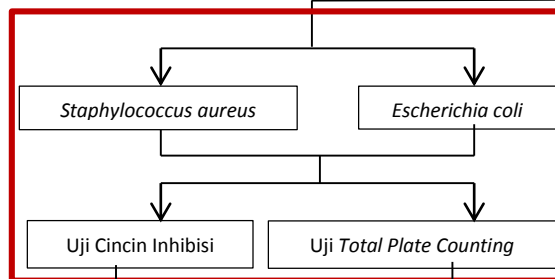
3.3. Metode Penelitian

Secara garis besar penelitian ini terdiri dari tahap sintesis, uji aktifitas antibakteri dan karakterisasi (Gambar 3.1). Tahap sintesis meliputi penyiapan larutan-larutan penyusun membran, pencetakan membran, dan *coating* membran dengan iodin. Pengujian aktifitas antibakteri membran dilakukan dengan metode cincin inhibisi (Kirby Bauer) dan metode *Total Plate Counting* (TPC) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Karakterisasi membran dilakukan menggunakan spektroskopi FTIR, difraksi sinar-X dan pengukuran *tensile strength*.

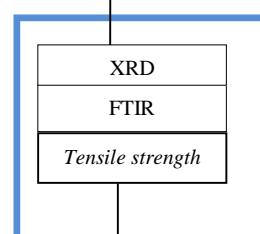
Sintesis



Uji Aktivitas Antibakteri



Uji Karakterisasi



Analisis data dan kesimpulan

Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Sintesis Membran Komposit Kitosan-PEG-MWCNT-Iodin

3.4.1.1. Preparasi

3.4.1.1.1. Pembuatan Larutan Kitosan 3%

Kitosan ditimbang sebanyak 3 gram, dilarutkan dalam 100 mL asam asetat 2% (asam asetat 98% sebanyak 2,04 mL ditambahkan akuades hingga 100mL). Diaduk menggunakan pengaduk mekanik selama satu jam pada suhu ruang.

3.4.1.1.2. Pembuatan Larutan PEG 2%

PEG ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian ditambahkan akuades 100 mL. Diaduk menggunakan batang pengaduk hingga kristal PEG larut seluruhnya.

3.4.1.1.3. Pembuatan Larutan MWCNT (Dispersi MWCNT dalam larutan GO)

Graphene Oxide (GO) ditimbang sebanyak 1 gram kemudian ditambahkan akuades 100 mL, lalu ditambahkan MWCNT sebanyak 0,001 gram. Diultrasonik selama 30 menit.

3.4.1.1.4. Pembuatan Larutan NaOH 1 M

NaOH ditimbang sebanyak 4 gram, kemudian dilarutkan dalam 100 mL akuades. Diaduk hingga NaOH larut semua.

3.4.1.2. Casting

Untuk membuat larutan casting, dicampurkan larutan kitosan 3%, larutan PEG 2%, larutan MWCNT 0,001% dengan perbandingan volume 8:4:3, kemudian diaduk selama 5-10 menit. Sebanyak 20 mL larutan casting dituang ke dalam cetakan polistirena (PS). Didiamkan selama 5-6 hari hingga membran benar-benar kering dan dapat dilepaskan dari cetakan. Membran yang telah kering dilepaskan dari cetakan, kemudian direndam dalam NaOH 1M selama 1 jam untuk menetralkan asam asetat. Membran kemudian dicuci dengan akuades hingga netral. Membran netral dikeringkan dalam suhu ruang selama satu malam sebelum *coating*.

3.4.1.3. Coating Iodin

Membran komposit Kitosan-PEG-MWCNT kering ditambahkan agen antibakteri iodin dengan cara direndam dalam larutan iodin. Kristal iodin dilarutkan dalam dua jenis pelarut yaitu etanol 96% dan akuades. Iodin dilarutkan dalam akuades dengan bantuan KI, KI tambahkan dengan jumlah 2 kali lipat massa iodin yang akan dilarutkan (Larutan Lugol). Larutan iodin dalam etanol maupun dalam akuades diencerkan hingga diperoleh larutan iodin dengan berbagai konsentrasi. Membran

komposit direndam dalam masing- masing larutan iodine (dengan volume yang sama) dan dibiarkan selama 30 menit. Seluruh tahap tersebut dilakukan dalam keadaan gelap cahaya dan dengan segera. Setelah 30 menit membran dibilas dengan pelarut iodine masing-masing (etanol atau akuades) kurang lebih 3 kali, atau hingga pelarut bilasan tidak berwarna. Membran kemudian dibilas sekali dengan n-heksan teknis untuk membersihkan iodine yang menempel dipermukaan. Terakhir membran dibilas lagi dengan pelarut untuk membersihkan n-heksan. Membran komposit kitosan/ PEG/-MWCNT-Iodine dikeringkan di suhu ruang selama satu malam sebelum digunakan untuk uji ataupun karakterisasi.

3.4.2. Karakterisasi Membran Kitosan-PEG-MWCNT-Iodine

3.4.2.1. Karakterisasi FTIR

Pengujian dengan menggunakan alat FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi dalam membran kitosan/ PEG/-MWCNT yang telah disintesis. Spektrum serapan inframerah yang dihasilkan material mempunyai pola yang khas. Prinsip dari instrumen FTIR ini adalah penyerapan radiasi inframerah oleh molekul-molekul yang menyebabkan vibrasi molekul.

3.4.2.2. Karakterisasi XRD

Salah satu metode karakterisasi dalam menentukan kristalinitas material adalah menggunakan alat instrumentasi *X-Ray Diffraction* (XRD). Metode ini mengidentifikasi fasa kristalin dalam material serta struktur kisinya. Penentuan kristalinitas dapat mengikuti persamaan Bragg dan Scherrer dengan melihat hubungan antara jarak interlayer dan kristalinitas sampel.

Persamaan Bragg:

$$n.\lambda = n.d.\sin\theta \quad (3.1)$$

dimana λ adalah panjang gelombang sinar-X yang digunakan, d adalah jarak *interfase*/jarak antara dua bidang kisi, θ adalah sudut antara sinar datang pada bidang normal, dan n adalah orde pembiasan. Makin banyak bidang kristal dalam sampel, makin kuat intensitas yang dihasilkan. Tiap puncak yang muncul pada pola XRD mewakili satu bidang kristal yang memiliki orientasi tertentu.

3.4.2.3. Tensile strength

Pengukuran *Tensile strength* atau kekuatan mekanik bertujuan untuk mengetahui kekuatan mekanik membran ketika diberikan gaya. Pada penelitian ini kekuatan mekanik yang diuji adalah elongasi/perpanjangan. Elongasi menyatakan ukuran seberapa besar pertambahan panjang material ketika dilakukan uji kekuatan tarik. Elongasi ditulis dalam bentuk persentase pertambahan panjang per panjang awal material yang diujikan.

3.4.3. Uji Aktivitas Antibakteri Membran Kitosan-PEG-MWCNT-Iodin

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan membran mencegah *biofouling*. Membran diujikan terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan bakteri gram negatif *Escherichia coli*. Uji antibakteri dilakukan dalam dua tahap, penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dengan metode cincin inhibisi (Kirby Bauer) dan pengujian efektifitas membran optimum dalam menghambat bakteri dengan metode *Total Plate Counting* (TPC).

3.4.3.1. Metode cincin inhibisi

Membran Kitosan-PEG-MWCNT-Iodin kering dibentuk cakram 5 mm kemudian disterilisasi dibawah sinar UV selama 30 menit. Bakteri *E. Coli* dan *S. aureus* muda masing-masing diinokulasi pada media tumbuh LB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi kemudian diencerkan dalam akuades steril hingga konsentrasi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml, dengan cara dibandingkan turbiditasnya dengan larutan Mc. Farland 0,5 *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-VIS (625 nm). Pada cawan petri steril dituangkan agar LB didiamkan hingga memadat. Permukaan agar kemudian dioleskan suspensi bakteri yang telah diencerkan menggunakan *cotton swab* steril mengikuti metode penggoresan Lawn (*Lawn streak method*). Cakram membran komposit diletakkan diatas agar yang telah dioleskan bakteri. Cakram kertas saring steril dicelupkan pada akuades steril dan diletakkan diatas agar sebagai kontrol negatif. Sebagai kontrol positif cakram kertas saring steril dicelupkan pada antibiotik standar, tetrasiklin 50 ppm. Seluruh tahap tersebut diatas dilakukan secara aseptik dalam laminar. Cawan petri berisi agar, bakteri, dan membran komposit kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dalam keadaan agar menghadap ke bawah. Setelah inkubasi 24 jam, diobservasi cincin inhibisi yang terbentuk disekitar membran. Cincin inhibisi diukur diameternya, dan dibandingkan dengan masing-masing konsentrasi iodine.

3.4.3.2. *Total Plate Counting (TPC)*

Membran komposit Kitosan/ PEG/ MWCNT/ iodin dibuat cakram (diameter = 5 mm). Cakram membran sebanyak dua buah diletakkan dalam tabung reaksi steril, kemudian ditetesi 10µl suspensi bakteri 0,5 OD (*E. Coli* dan *S. Aureus*). Cakram membran dengan konsentrasi sama diletakkan diatas cakram yang telah ditetesi suspensi bakteri. Dibiarkan selama 30 menit. Kedalam tabung berisi membran dan bakteri, dipipet *phosphate-buffered saline* (PBS) 10 mL, kemudian isi tabung dihomogenkan dengan *vortex*. Dari tabung berisi membran dipipet 1 mL larutan kedalam tabung reaksi lain yang berisi 9mL PBS. Tabung kedua divortex lalu dipipet lagi 1ml dari tabung kedua kedalam tabung ketiga, dan dari tabung ketiga dipipet 1ml ke tabung ke empat yang masing-masing berisi 9ml PBS. Dari tabung pertama hingga tabung ke-lima dipipet 1mL larutan kedalam cawan petri steril. Kedalam cawan petri dituang agar PCA dan diaduk perlahan. Agar berisi bakteri didiamkan hingga mengeras. Cawan berisi agar dan bakteri diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam koloni bakteri yang terbentuk pada agar dihitung. Prosedur tersebut dilakukan secara aseptik.