

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahap diantaranya adalah tahap sintesis, uji karakterisasi, uji aktivitas antibakteri, dan uji kinerja membran. Sintesis membran dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Tahap karakterisasi membran yakni; Uji FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen, FPMIPA A Universitas Pendidikan Indonesia, uji SEM dilakukan di Laboratorium *Plasticity Control and Mechanical Modelling*, Universitas Yeungnam, Korea, uji *contact angle*, porositas, dan *average pore radius* membran dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia, sedangkan uji kekuatan mekanik dilakukan di Balai Besar Tekstil, Bandung. Uji aktivitas antibakteri (uji cincin inhibisi (*agar disk diffusion*), dan *total plate counting* (TPC) ) dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat, Bandung. Kinerja membran (permeabilitas) dievaluasi menggunakan set alat filtrasi *dead-end* di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Penelitian dimulai pada bulan Februari 2017 hingga Juli 2017.

### 3.2 Alat dan Bahan

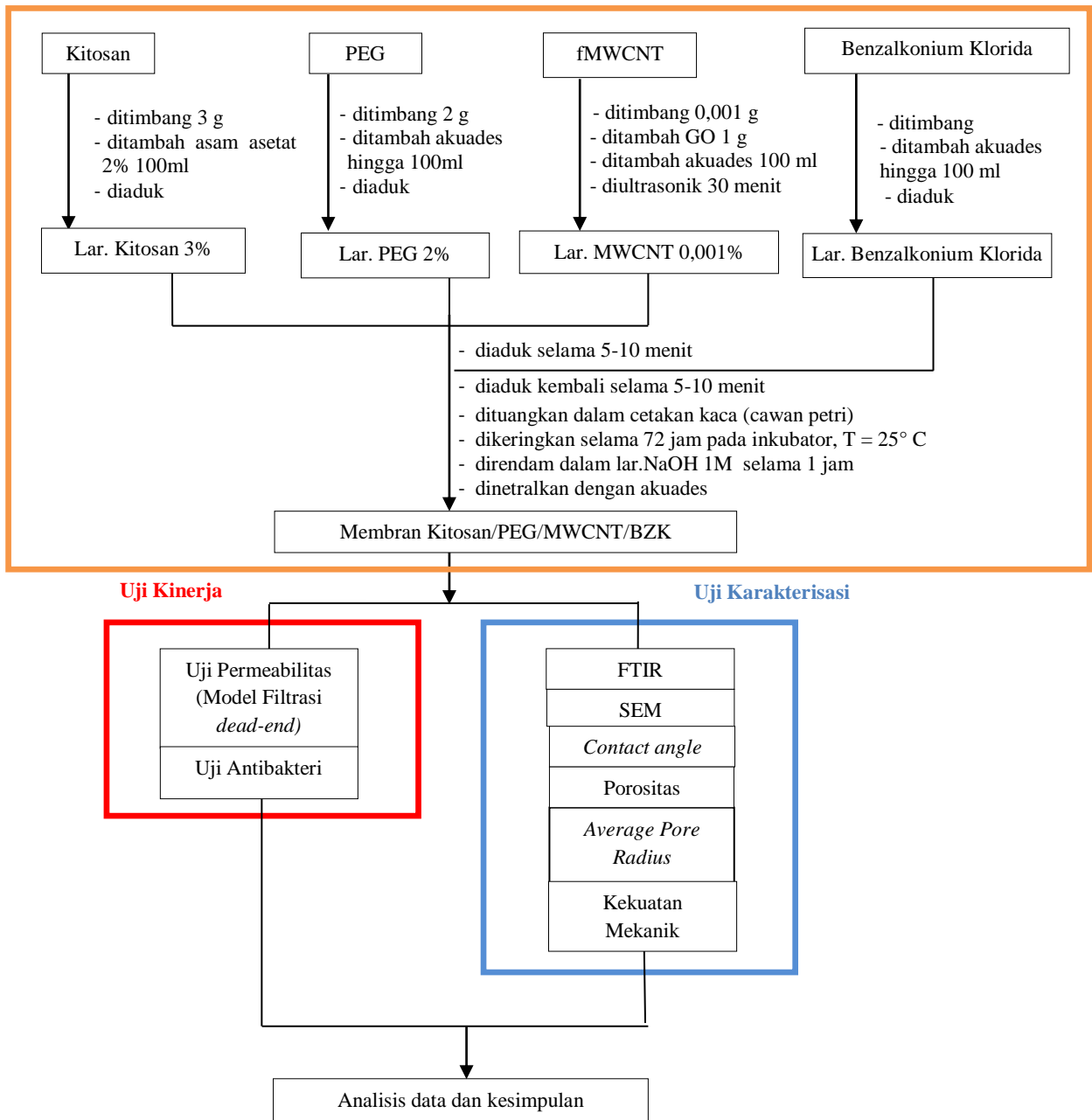
Bahan yang digunakan adalah Kitosan (DD 87,5%), Polietilen Glikol 6000 (PEG 6000), Natrium Hidroksida (NaOH), Asam asetat 98%, Akuades, Benzalkonium Klorida, *Graphene Oxide suspended* (GO) (metode *Hummer*), *Multiwall Carbon Nanotubes* (MWCNT) dengan metode *Chemical Vapor Deposition* (CVD), menghasilkan MWCNT~100 nm *bundle*. MWCNT di fungsionalisasi 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 analitik, alat pencetak membran (cawan petri). Sedangkan untuk karakterisasi membran digunakan beberapa instrumentasi yaitu Shimadzu *Fourier Transform Infrared* (FTIR), dan Textechno 41066 untuk uji kekuatan mekanik.

### 3.3 Metode Penelitian

Secara garis besar, penelitian ini terdiri dari tahap sintesis, karakterisasi, uji aktivitas antibakteri, dan uji kinerja membran (Gambar 3.1). Tahap sintesis meliputi persiapan larutan penyusun membran, serta pencetakan membran. Karakterisasi membran dilakukan menggunakan spektroskopi FTIR, SEM, pengukuran *contact angle*, porositas, *average pore radius*, serta pengukuran kekuatan mekanik (*tensile strength* dan *elongation at break*). Tahap pengujian aktivitas antibakteri membran dilakukan melalui pengukuran cincin inhibisi yang terbentuk menggunakan metode *agar disk diffusion* dan penentuan *bacteria killing ratio* (BKR) menggunakan metode *Total Plate Counting* (TPC). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan gram negatif *Escherichia coli*. Kinerja membran (permeabilitas) dievaluasi menggunakan set alat filtrasi *dead-end*.

## Sintesis



**Gambar 3.1.** Diagram Alir Penelitian

### **3.4 Prosedur Penelitian**

#### **3.4.1 Sintesis Membran Komposit Kitosan/PEG/MWCNT/BZK**

##### **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 100 ml). 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 seluruhnya.

###### **3.4.1.1.5 Pembuatan Larutan QAC Benzalkonium Klorida**

Benzalkonium klorida dengan massa bervariasi ditimbang dan ditanda bataskan menggunakan akuades hingga 100 ml.

##### **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. Selanjutnya, larutan casting ditambahkan 5 ml agen antibakteri QAC benzalkonium klorida dengan variasi konsentrasi dan kembali diaduk selama 5-10 menit. Sebanyak 35 ml larutan casting selanjutnya dituang kedalam cetakan kaca (cawan petri). Didiamkan selama 72 jam di dalam inkubator ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ) hingga membran benar-benar kering dan dapat dilepaskan dari cetakan. Membran yang telah

kering dilepaskan dari cetakan, kemudian direndam dalam NaOH 1 M selama 1 jam untuk menetralkan asam asetat. Membran kemudian dicuci dengan akuades hingga netral. Membran netral dikeringkan dalam suhu ruang selama satu malam sebelum dilakukan uji ataupun karakterisasi.

### **3.4.2 Karakterisasi Membran Kitosan/PEG/MWCNT/BZK**

#### **3.4.2.1 Karakterisasi FTIR**

Karakterisasi menggunakan instrumentasi FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi dalam membran Kitosan/PEG/MWCNT/BZK yang telah disintesis. Suatu material akan memiliki pola spektrum serapan infra merah yang khas. Prinsip dari instrumentasi FTIR ini adalah penyerapan radiasi inframerah yang menyebabkan vibrasi molekul.

#### **3.4.2.2 Karakterisasi SEM**

Karakterisasi menggunakan instrumentasi SEM bertujuan untuk mengetahui morfologi permukaan dan penampang melintang membran. Foto morfologi diperoleh berdasarkan hasil deteksi elektron yang dihamburkan atau berdasarkan elektron sekunder yang berasal dari permukaan sampel (Setiabudi *et al.*, 2012).

#### **3.4.2.3 Kekuatan Mekanik**

Pada penelitian ini kekuatan mekanik yang diuji adalah *tensile strength* dan pengukuran *elongation at break*. Pengukuran *tensile strength* atau kekuatan mekanik bertujuan untuk mengetahui kekuatan mekanik membran ketika diberikan gaya. Sedangkan *elongation at break* diukur untuk mengetahui pertambahan panjang membran ketika ditarik hingga putus. Pengukuran *tensile strength* dan *elongation at break* dilakukan menggunakan alat *Textechno Favigraph*.

#### 3.4.2.4 *Contact angle*

Pengukuran *contact angle* bertujuan untuk menentukan hidrofilitas permukaan membran. Perhitungan *contact angle* permukaan membran dilakukan menggunakan aplikasi *ImageJ*. Sebelum pengukuran, terlebih dahulu disimpan di dalam desikator selama 24 jam. Akuabides sebanyak 20 µl selanjutnya diteteskan di atas permukaan membran yang homogen dan datar menggunakan *microsyringe*, kemudian *contact angle* yang diperoleh dihitung.

#### 3.4.2.5 Porositas

Porositas membran ditentukan dengan metode *dry-wet weight*. Membran direndam dalam akuabides selama 24 jam kemudian dilap menggunakan kertas saring, selanjutnya berat membran basah ditimbang. Selanjutnya, membran basah dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Membran kering selanjutnya ditimbang. Porositas membran dapat dihitung dari nilai selisih berat kedua membran (sampel membran basah dan kering), porositas dihitung menggunakan persamaan 3.1.:

$$\varepsilon \% = \frac{\frac{W_w - W_d}{\rho_w}}{\frac{W_w - W_d}{\rho_w} + \frac{W_d}{\rho_p}} \times 100\% \quad (3.1)$$

$W_w$  = berat membran basah (g)

$W_d$  = berat membran kering (g)

$\rho_w$  = densitas air (g/cm<sup>3</sup>)

$\rho_p$  = densitas polimer (g/cm<sup>3</sup>).

(Garcia *et al.*, 2014)

### 3.4.2.6 Average Pore Radius ( $r_m$ )

Ukuran pori membran dinyatakan dalam *average pore radius* ( $r_m$ ). *Average pore radius* ( $r_m$ ) dianggap sebagai perkiraan ukuran pori sesungguhnya dan mewakili ukuran pori sepanjang ketebalan membran. *Average pore radius* dapat dihitung menggunakan persamaan *Guerout-Elford-Fery*:

$$r_m = \frac{2,9 - 1,75 \times \varepsilon \times 8 \times \mu \times \zeta \times Q_w}{\varepsilon \times A_m \times \Delta P} \quad (3.2)$$

$\varepsilon$  = porositas membran

$\mu$  = viskositas air ( $8,9 \times 10^{-4}$  Pa.s)

$\zeta$  = ketebalan membran (m)

$Q_w$  = flow air ( $m^3 \cdot s^{-1}$ )

$A_m$  = luas area membran ( $m^2$ )

$\Delta P$  = tekanan (Pa)

(Yuliwati *et al.*, 2011)

### 3.4.3 Uji Aktivitas Antibakteri Membran Kitosan/PEG/MWCNT/BZK

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, yakni penentuan aktivitas antibakteri membran dengan metode *agar disk diffusion*, dan penentuan *bacteria killing ratio* (BKR) menggunakan metode *total plate counting* (TPC).

#### 3.4.3.1 Metode *agar disk diffusion*

Membran nanokomposit Kitosan/PEG/MWCNT/BZK kering dibentuk cakram 5 mm kemudian disterilisasi dibawah sinar UV selama satu jam. Bakteri *S. aureus* dan *E. Coli* muda masing-masing diinokulasi pada media tumbuh LB (*Lactose Broth*) dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Suspensi kemudian diencerkan dalam NaCl 0,9% steril hingga konsentrasi  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml, dengan cara dibandingkan turbiditasnya dengan larutan standar 0,5 *Mc. Farland* menggunakan densitometer. Pada cawan petri steril

dituangkan agar *Müller Hinton* dan didiamkan hingga memadat. Permukaan agar kemudian dioleskan suspensi bakteri yang telah diencerkan menggunakan *cotton swab* steril mengikuti metode penggoresan Lawn (*Lawn streak method*). Selanjutnya cakram membran nanokomposit, cakram kontrol positif, dan kontrol negatif diletakkan diatas agar yang telah dioleskan bakteri. Cakram antibiotik standar tetrasiklin 30 µg dan cakram kertas saring steril digunakan sebagai kontrol positif dan negatif. Seluruh tahap tersebut dilakukan secara aseptik. Cawan petri berisi agar, bakteri, dan cakram kemudian diinkubasi pada 37°C selama 24 jam dalam keadaan agar menghadap ke bawah. Setelah inkubasi selama 24 jam, cincin inhibisi yang terbentuk disekitar cakram membran diobservasi, diukur diameternya, dan dibandingkan dengan masing-masing variasi konsentrasi agen antibakteri benzalkonium klorida.

#### **3.4.3.2 Metode perhitungan unit koloni bakteri (*total plate counting / TPC*).**

Membran nanokomposit Kitosan/PEG/MWCNT/BZK dibentuk cakram (diameter = 5 mm). Cakram membran sebanyak dua buah diletakkan dalam tabung reaksi steril, kemudian ditetesi 10 µl suspensi bakteri dengan konsentrasi  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml (*S. aureus* dan *E. coli*). Cakram membran dengan konsentrasi sama diletakkan diatas cakram yang telah ditetesi suspensi bakteri, kemudian 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 9 ml PBS. Tabung kedua di *vortex* lalu dipipet lagi 1 ml dari tabung kedua kedalam tabung ketiga, dan dari tabung ketiga dipipet 1 ml ke tabung ke empat yang masing-masing berisi 9 ml PBS. Dari tabung pertama hingga tabung ke lima dipipet 1 ml larutan kedalam cawan petri steril. Kedalam cawan petri dituang agar PCA (*plate count agar*) dan diaduk perlahan. Agar berisi bakteri didiamkan hingga mengeras. Cawan berisi agar dan bakteri diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Setelah 24 dan 48 jam, koloni bakteri



yang terbentuk pada agar dihitung. Prosedur tersebut dilakukan secara aseptik.

#### 3.4.4 Uji Kinerja

Kinerja membran dievaluasi melalui uji permeabilitas. Uji permeabilitas bertujuan untuk mengetahui kemampuan air / laju fluks air dalam melewati membran. Pada pengujian permeabilitas digunakan akuabides dan set alat filtrasi *dead end*. Gambaran detail alat filtrasi sistem *dead end* diilustrasikan gambar 3.2. Pada filtrasi sistem *dead end*, membran dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter 5 cm (d disesuaikan dengan desain alat filtrasi) kemudian diletakkan didalam alat filtrasi. Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan kompaksi terhadap membran. Kompaksi membran dilakukan agar diperoleh harga fluks air yang konstan. Kompaksi dilakukan dengan cara filtrasi akuabides pada tekanan 2 atm selama satu jam. Fluks air ditentukan menggunakan persamaan 3.3.

$$J = \frac{V}{A_m \times t} \quad (3.3)$$

Dimana:

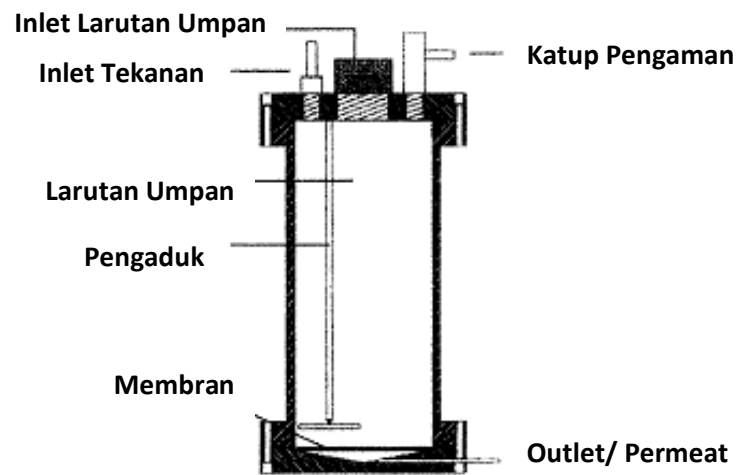
J = fluks permeasi (L/m<sup>2</sup>.jam)

V = volume sampel yang tersaring (L)

A<sub>m</sub> = luas permukaan membran (m<sup>2</sup>)

t = waktu filtrasi (jam).

(Vasanth *et al.*, 2013).



**Gambar 3.2** Set alat filtrasi *dead end* (Krieg, 2004).