

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Sintesis membran dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Uji aktivitas antibakteri dengan metode cincin inhibisi dan *total plate counting* (TPC) dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jawa Barat, Bandung dan Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Sedangkan tahap karakterisasi membran meliputi FTIR, SEM, XRD, dan AFM dilakukan di *Departement of Advanced Material Engineering*, Universitas Yeungnam, Korea. Pengukuran *contact angle* dan porositas membran dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Lingkungan Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia. Uji kekuatan mekanik dan stabilitas termal dilakukan di *Center for Energy and Environmental Science*, Universitas Shinshu, Jepang. Penelitian dimulai pada bulan Februari hingga Oktober 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 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 difungsionalisasi menggunakan asam kuat (H_2SO_4 dan HNO_3), *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Eosin Methylene Blue Agar* (EMB), *Salt Manitol Agar*, Natrium Klorida (NaCl), Kalium Klorida (KCl), Dinatrium Posfat (Na_2HPO_4), Kalium Dihidrogen Posfat (KH_2PO_4), Asam Klorida (HCl), Asam Sulfat (H_2SO_4), Barium Klorida ($BaCl_2$), *Cotton Swab*, Spiritus, Kloroamfenikol, dan Alkohol 70%.

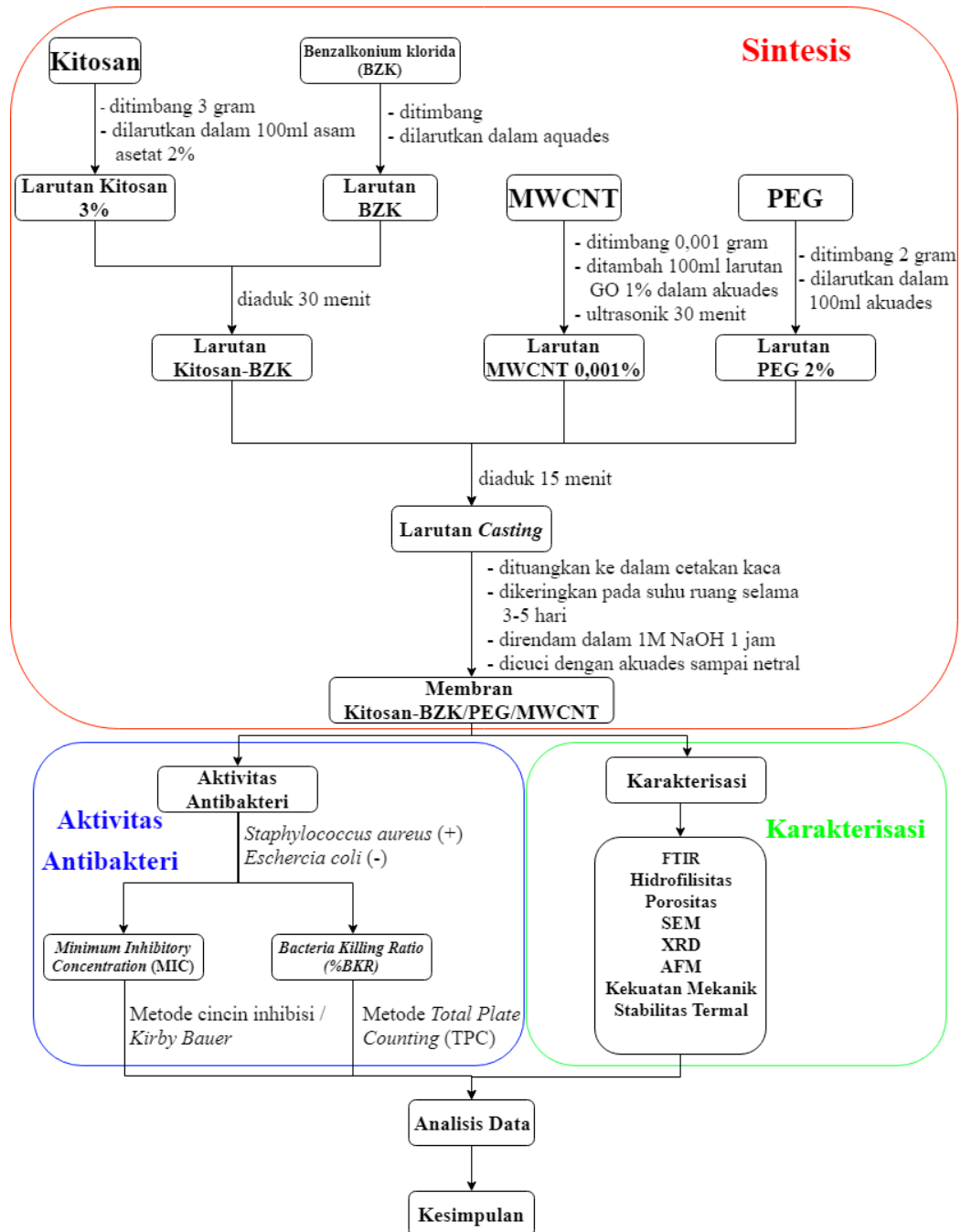
3.2.2 Alat

- Tahap sintesis
Alat yang digunakan meliputi gelas kimia (100 ml, 250 ml, 400 ml), gelas ukur (10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml), labu takar (25 ml dan 100 ml), kaca arloji, batang pengaduk, spatula, botol semprot, *magnetic stirrer*, pipet ukur (1 ml, 10 ml, 25 ml), pipet seukuran 5 ml, *magnetic bar*, pengaduk mekanik, inkubator, sonikator, neraca analitik, *microsyringe*, mikrometer digital dan cetakan membran (cawan petri) diameter 90 mm.
- Tahap uji aktivitas antibakteri
Cawan petri kaca, laminar, inkubator, turbidimeter, *vortex mixer*, *autoclave*, panci tekan, *thermoshaker*, *colony counter*, jangka sorong 0,1 mm, kaca arloji, tabung reaksi, rak tabung, batang pengaduk, spatula, botol semprot, *magnetic stirrer*, *hot plate*, labu erlenmeyer (100 ml dan 250 ml), gelas kimia 250 ml, *thermoplastic*, pinset besi, pembakar spirtus dan jarum ose.
- Tahap karakterisasi
Instrumentasi yang digunakan yaitu *Fourier Transform Infrared (FTIR-Shimadzu)*, *Scanning Electron Microscope (SEM-Hitachi S-4800)*, *X-Ray Diffraction (XRD-Rigaku, D-Max 2500)*, *Atomic force microscope (AFM-Park XE-100)*, *tensile strength meter (Shimatzu EZ-EX-500M)* dan *Thermal Gravimetric Analyser (TGA-Hitachi 7200)*

3. 1 Metode Penelitian

Secara garis besar, penelitian ini terdiri dari tahap sintesis, uji aktivitas antibakteri, dan karakterisasi (Gambar 3.1). Tahap sintesis meliputi penyiapan larutan prekursor membran, *casting* membran dengan benzalkonium klorida dan pencetakan membran. Tahap pengujian aktivitas antibakteri membran dilakukan

melalui metode cincin inhibisi untuk menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan metode *Total Plate Counting* (TPC) untuk menentukan *bacteria killing ratio* (%BKR). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 12022) dan gram negatif *Escherichia coli* (ATCC 25922). Karakterisasi membran yang dilakukan meliputi karakteristik morfologi dan kimia dengan FTIR, uji morfologi dengan SEM, uji XRD, uji kekerasan menggunakan AFM, pengukuran *contact angle* dilakukan dengan metode *sessile drop* dan dievaluasi dengan *Java Software ImageJ*, pengukuran porositas dengan metode *dry-wet weight*, pengukuran stabilitas termal dengan TGA, serta pengukuran kekuatan mekanik (*tensile strength* dan *elongation at break*) dengan *tensile strength meter*.



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3. 2 Prosedur Penelitian

3.2.3 Sintesis Membran Komposit Kitosan-BZK/ PEG/ MWCNT

3.2.3.1 Preparasi

3.2.3.1.1 Pembuatan Larutan Kitosan 3%

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

3.2.3.1.2 Pembuatan Larutan PEG 2%

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

3.2.3.1.3 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 - 60 menit.

3.2.3.1.4 Pembuatan Larutan NaOH 1 M

NaOH ditimbang sebanyak 4 gram, kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades. Diaduk hingga NaOH larut seluruhnya.

3.2.3.1.5 Pembuatan Larutan *Benzalkonium Klorida* (BZK)

Benzalkonium klorida dengan massa bervariasi ditimbang dan ditanda bataskan menggunakan akuades hingga 25 ml.

3.2.3.2 Casting Membran

Untuk membuat larutan casting, dicampurkan larutan kitosan 3% dan larutan agen antibakteri benzalkonium klorida/ BZK dengan variasi konsentrasi kemudian diaduk selama 30 menit. Larutan kitosan-BZK ditambah dengan larutan PEG 2% dan larutan MWCNT 0,001% kemudian diaduk 15 menit. Perbandingan volume kitosan: BZK: PEG: MWCNT adalah 8:2,5:4:3. Sebanyak 25 mL larutan casting selanjutnya dituang kedalam cetakan kaca (cawan petri) dengan diameter (ϕ) 90 mm. Larutan casting kemudian di inkubasi selama 3-5 hari di dalam inkubator ($T = 25^{\circ}\text{C}$) sampai membran benar-benar kering dan dapat dilepaskan dari cetakan. Membran yang telah kering direndam dalam NaOH 1 M selama 1 jam untuk menetralkan asam asetat. Membran kemudian dicuci dengan akuades hingga suhu air bilasan netral. Membran netral dikeringkan dalam suhu ruang selama satu malam sebelum diuji ataupun dikarakterisasi.

3.3 Uji Aktivitas Anti-Bakteri

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 dan pengujian efektifitas membran pada konsentrasi optimum dalam menghambat bakteri dengan metode *Total Plate Counting* (TPC) (Balouri, Sadika dan Ibsouda, 2016).

3.3.1 *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Membran kitosan-BZK/ PEG/ MWCNT kering dibentuk cakram (diameter = 6 mm) kemudian disterilisasi dibawah sinar UV selama 60 menit. Bakteri *E. Coli* dan *S. aureus* muda masing-masing diinokulasi pada 100 ml media tumbuh NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Suspensi bakteri kemudian diinkubasi kembali dalam 100 ml NB yang baru selama 4-8jam untuk memperoleh bakteri pada fasa aktif (*log phase*).

Suspensi kemudian diencerkan dalam *phosphate-buffered saline* (PBS) steril hingga konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, dengan cara dibandingkan turbiditasnya dengan larutan Mc. Farland 0,5 *Optical Density* (OD) menggunakan turbidimeter. Pada cawan petri steril dituangkan 10 ml NA dan didiamkan hingga memadat. Permukaan agar kemudian dioleskan suspensi bakteri 0,5 OD menggunakan *cotton swab* steril mengikuti metode penggoresan Lawn (*Lawn Streak Method*). Cakram membran komposit dicelupkan pada akuades steril, kemudian ditiriskan dan diletakan 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, kloramfenikol 500 ppm. Seluruh tahap tersebut diatas dilakukan secara aseptik dalam laminar. Cawan petri berisi agar, bakteri, dan membran komposit kemudian diinkubasi pada 37°C selama 16 - 24 jam dalam keadaan agar menghadap ke bawah. Setelah di inkubasi, cincin inhibisi yang terbentuk disekitar membran diobservasi. Cincin inhibisi diukur diameternya, diameter cincin dibandingkan antar membran dengan konsentrasi BZK yang berbeda. Pengujian dilakukan secara triplo untuk masing-masing varian konsentrasi (Cavalieri *et al.*, 2005; Balouri, Sadika dan Ibsouda, 2016).

3.3.2 Total Plate Counting (TPC)

Membran nanokomposit kitosan-BZK/ PEG/ MWCNT dibentuk cakram (diameter = 6 mm) kemudian disterilisasi dibawah sinar UV selama 60 menit. Cakram membran sebayak diletakan dalam tabung reaksi steril, kemudian ditetesi 10 μl suspensi bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Cakram membran dengan konsentrasi sama diletakkan diatas cakram yang telah ditetesi suspensi bakteri, kemudian dibiarkan selama 30 menit. Ke dalam tabung berisi membran dan bakteri, dipipet *phosphate-buffered saline* (PBS) 10 ml, kemudian isi tabung dihomogenkan dengan *vortex mixer*. 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 ke dalam 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 ke dalam cawan petri steril. Ke dalam cawan petri dituang 9 ml 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 dengan posisi agar menghadap ke bawah. Setelah 24 dan 48 jam, koloni bakteri yang terbentuk pada agar dihitung dan diproses menggunakan Persamaan 3.3. Prosedur tersebut dilakukan secara aseptik untuk masing-masing bakteri *E. Coli* dan *S. aureus*. Pengenceran dan penghitungan koloni dilakukan secara duplo untuk masing-masing sampel (Balouri, Sadika dan Ibsouda, 2016).

$$\text{bacteria killing ratio (\%)} = \frac{Nb - Ns}{Nb} \times 100 \quad (3.3)$$

dimana Nb adalah jumlah dari bakteri yang hidup pada kontrol positif dan Ns adalah jumlah bakteri yang tersisa/ hidup pada suspensi yang telah dikontakan dengan membran. %BKR menunjukkan kemampuan sifat bakterisidal dari membran (Karkhanechi *et al.*, 2013).

3.4 Karakterisasi Membran Kitosan-BZK/ PEG/ MWCNT

3.4.1 Interaksi Kimia

Interaksi kimia (gugus fungsi) yang terjadi dalam pembentukan membran dapat diketahui dengan bantuan instrumen FTIR. Membran nanokomposit Kitosan/PEG/MWCNT sebelum dan sesudah dimodifikasi diuji dan dibandingkan untuk mengetahui pengaruh secara kimia dari modifikasi dengan BZK. Hal ini dapat dilakukan karena FTIR dapat mendeteksi pola spektrum serapan infra merah yang khas dari suatu material yang melakukan vibrasi molekul karena adanya penyerapan radiasi inframerah (Mudzakir, 2008).

3.4.2 Morfologi dan Ukuran Pori

Karakterisasi instrumentasi SEM bertujuan untuk mengetahui morfologi pori dari penampang melintang membran. Membran dipotong dengan luas area $1 \times 1 \text{ cm}^2$ dengan menggunakan nitrogen cair. Foto morfologi diperoleh berdasarkan hasil deteksi elektron yang dihambur balikkan atau berdasarkan elektron sekunder yang berasal dari permukaan sampel. Selain itu hasil SEM juga dapat memberikan informasi ukuran pori pada membran (Wyart *et al.*, 2008).

3.4.3 XRD

Karakterisasi dengan XRD ditujukan untuk melihat pengaruh BZK terhadap *crystal size* pada membran. Jarak interlayer dan kristalin sampel ditentukan dengan menganalisa persamaan Bragg dan Scherrer (Waseda, Matsubara dan Shinoda, 2011).

3.4.4 Roughness / Kekerasan

Karakterisasi dengan AFM ditujukan untuk memberikan informasi kekerasan/ *roughness* dari permukaan membran. Arus listrik yang mengalir di antara *tip* dan sampel melalui ruang hampa berhubungan dengan jarak di antara mereka. Morfologi permukaan secara tiga dimensi (3D) dipetakan berdasarkan arus di setiap piksel permukaan menggunakan komputer. Hasil uji antara membran nanokomposit sebelum dan sesudah dimodifikasi akan dibandingkan (Lee, Elam dan Darling, 2016).

3.4.5 Kekuatan Mekanik

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 instrumen *tensile strength meter*. Sebelum diuji, sampel akan dipotong dengan lebar dan panjang yang telah disesuaikan dengan jarak jepit dari instrumen. Hasil uji antara

membran nanokomposit sebelum dan sesudah dimodifikasi akan dibandingkan (Swallowe, 1999).

3.4.6 Hidrofilisitas (Sudut Kontak / *Contact Angle*)

Pengukuran *contact angle* bertujuan untuk menentukan hidrofilisitas permukaan membran. Perhitungan *contact angle* permukaan membran dilakukan menggunakan metode *sessile drop* dan dievaluasi dengan aplikasi *Java Software ImageJ*. Sebelum pengukuran dilakukan, membran kering terlebih dahulu disimpan di dalam desikator selama 24 jam untuk memastikan tidak ada molekul air pada membran. Setelah itu 20 μL akuabides diteteskan di atas permukaan membran yang datar menggunakan *microsyringe*, kemudian *contact angle* yang diperoleh dievaluasi. Pengukuran *contact angle* dilakukan di 5 titik yang berbeda pada setiap sampel. Hasil uji antara membran nanokomposit sebelum dan sesudah dimodifikasi akan dibandingkan (Stalder *et al.*, 2006).

3.4.7 Porositas

Porositas membran ditentukan dengan metode *dry-wet weight*. Membran direndam dalam akuabides selama 24 jam, selanjutnya air yang berlebih pada membran di hilangkan dengan *filter paper*, berat membran basah ditimbang. Selanjutnya, membran basah dikeringkan dalam inkubator pada suhu 50°C selama 24 jam. Membran kering ditimbang. Porositas membran dapat dihitung dari nilai selisih berat kedua membran (sampel membran basah dan kering) menggunakan persamaan 3.2. Pengujian dilakukan secara triplo. Hasil uji antara membran nanokomposit sebelum dan sesudah dimodifikasi akan dibandingkan.

$$\varepsilon(\%) = \frac{\frac{W_w - W_d}{\rho_w}}{W_w - W_d + \frac{W_d}{\rho_p}} \times 100\% \quad (3.2)$$

W_w = berat membran basah (g)

W_d = berat membran kering (g)

ρ_w = densitas air (g/cm^3)

ρ_p = densitas polimer (g/cm^3).

(Garcia *et al.*, 2014)

3.4.8 Stabilitas Termal

TGA (*Thermal Gravimetric Analysis*) adalah salah satu teknik untuk mengukur stabilitas termal dari suatu material. TGA mengukur perubahan jumlah dan laju dari massa material sebagai fungsi dari temperatur atau waktu dalam atmosfer yang terkontrol (aliran gas inert) dengan bantuan instrumen *Thermal Gravimetric Analyser*. Sampel akan diletakan pada sebuah *pan* yang didukung oleh sebuah *precision balance*, kemudian dimasukan kedalam suatu *furnace* untuk nantinya dipanaskan/diinginkan sesuai kebutuhan. Perubahan massa dari sampel akan direkam oleh detektor. Sampel akan dialiri oleh gas inert untuk mengontrol lingkungan sampel yang masuk dan keluar melalui *exhaust*. Hasil uji antara membran nanokomposit sebelum dan sesudah dimodifikasi akan dibandingkan (Perkin Elmer, 2010).