

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap diantaranya adalah sintesis, uji aktivitas antibakteri, dan karakterisasi membran komposit. Secara khusus karakterisasi membran meliputi Uji FTIR, SEM, Kekuatan Mekanik, Hidrofilisitas, Porositas. Semua tahap penelitian dilakukan di Pusat Loka Penelitian Teknologi Bersih LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), Bandung. Penelitian dimulai pada bulan Februari sampai Juli 2020.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah kitosan, polietersulfon, natrium hidroksida (NaOH), asam asetat glacial 100%, amonium klorida, DMAc dari EMD Milipore Co, Germany, Nutrient Agar (Merck KGaA), nutrient Broth, dan kloramfenikol, (prekursor dan pelarut diperoleh dari Merck KGaA), akuades dan alkohol 70%

3.2.2 Alat

- **Tahap Sintesis**

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, neraca analitis, alat *casting* membran (plat Kaca),

- **Tahap Uji Aktivitas Antibakteri**

Cawan petri kaca, tabung ulir, jarum ose, incubator, *vortex*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, sudip, *hot plate*, *magnetic stirrer*, labu Erlenmeyer 500 mL, pinset besi, pembakar spirtus, *Autoclave* (TOMY SX-300)

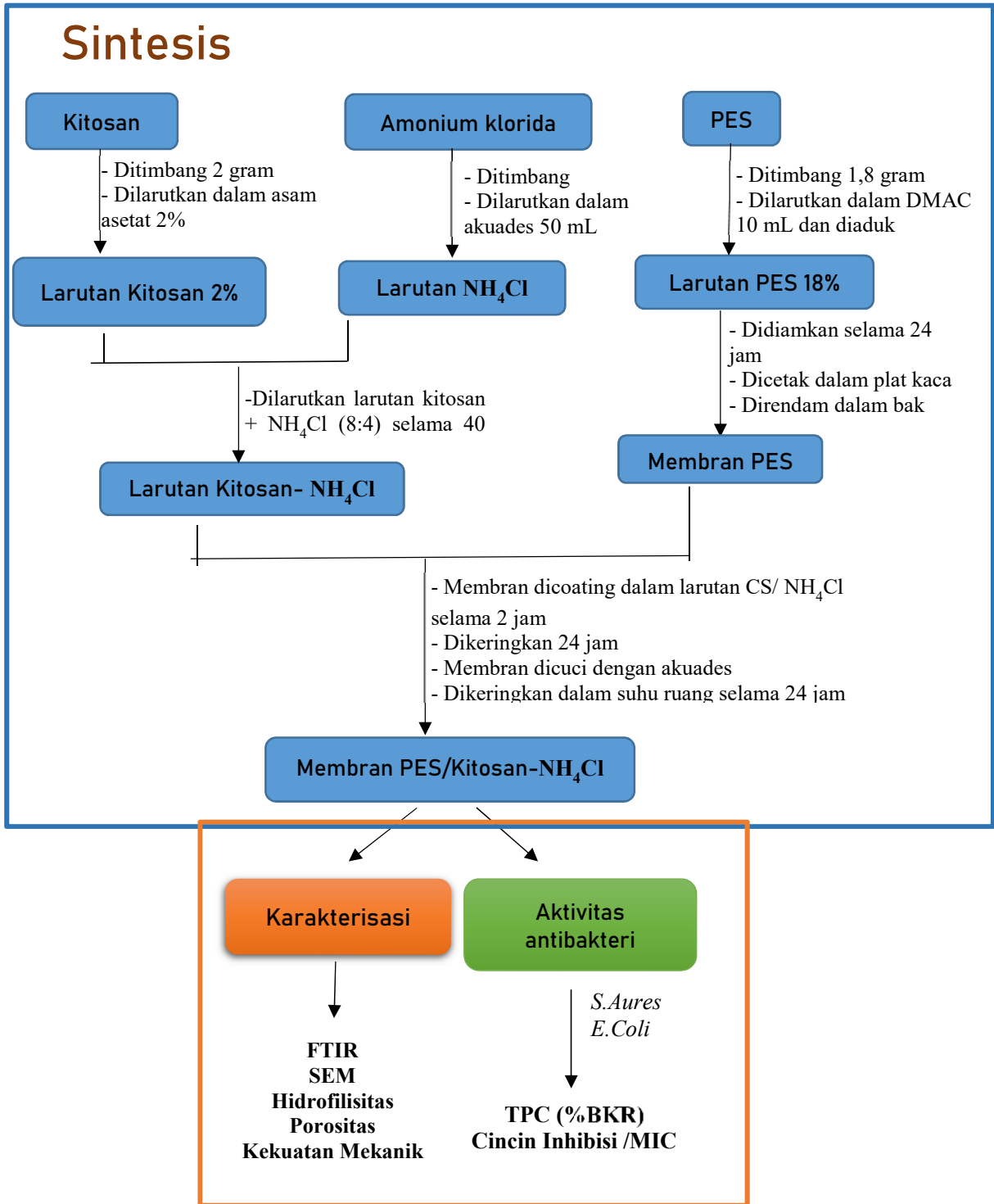
- **Tahap Karakterisasi**

Karakterisasi membran menggunakan beberapa instrumentasi yaitu FTIR (*Fourier Transform Infrared*) Nicolet IS5, uji kekuatan mekanik,

SEM (*Scanning Electron microscope*) Jeol/JMS IT300 LV, *Coating* SEM
DII-29030SCTR

3.3. Metode Penelitian

Secara garis besar penelitian ini terdiri dari tahap sintesis, uji aktifitas antibakteri dan karakterisasi membrane komposit (Gambar 3.1). Tahap sintesis meliputi penyiapan larutan-larutan penyusun membran, pencetakan membran, dan *coating* membran dengan kitosan dan ammonium klorida. 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, SEM, Porositas, Hidrofilisitas, dan pengukuran *tensile strength* (UCT series dumbbell ISO 527-2-5B)



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sintesis Membran Komposit Kitosan-NH₄Cl/PES

a. Preparasi

• Pembuatan Larutan Kitosan 2%

Kitosan ditimbang sebanyak 2 gram, dilarutkan dalam 100 ml asam asetat 2% (asam asetat glacial 100% sebanyak 2 mL diencerkan dengan akuades hingga 100 ml). Diaduk menggunakan pengaduk mekanik hingga larut pada suhu ruang.

• Pembuatan Larutan PES 18%

PES ditimbang sebanyak 1,8 gram, kemudian ditambahkan DMAc 10 mL. Diaduk menggunakan batang pengaduk hingga PES larut seluruhnya.

• Pembuatan Larutan NaOH 1 M

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

• Pembuatan Larutan Amonium klorida (NH₄Cl)

Amonium klorida dengan massa bervariasi ditimbang, dilarutkan dalam air dan ditanda bataskan menggunakan akuades hingga 50 mL.

b. Casting Membran

Larutan casting (Larutan PES 18%) sebanyak 10 mL dituangkan ke atas pelat kaca yang bagian tepi diberi ketebalan sesuai yang diinginkan pada proses pembuatan membran. Selanjutnya "casting knife" digerakkan ke atas untuk membentuk lapisan tipis pada pelat kaca. Setelah itu larutan casting direndam dalam bak koagulasi yang berisi air selama 3 jam pada suhu ruangan. Membran yang telah dicetak dan direndam kemudian dikeringkan dengan *filter paper* sebelum *dicoating*.

c. Coating Membran

Untuk membuat larutan *coating*, dicampurkan larutan kitosan 2% dan larutan agen antibakteri ammonium klorida (NH₄Cl) kemudian diaduk selama 40 menit. Perbandingan volume kitosan: NH₄Cl adalah 8:4. Membran PES dicelupkan dalam larutan *coating* selama 2 jam. Membran komposit dikeringkan selama 1 hari dalam media pengeringan membran. 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.

3.4.2 Karakterisasi Membran Kitosan-NH₄Cl/PES

a. Interaksi Kimia

Pengujian dengan menggunakan alat FTIR bertujuan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi dalam membran kitosan-NH₄Cl/PES yang telah disintesis. Sampel diuji dengan mencampurkan membran sebesar $\pm 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ dan serbuk KBr. Lalu sampel diletakkan pada tabung silinder seperti mur. 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.

b. Morfologi dan Ukuran Pori Membran

Potongan membrane/nanofiber sebesar $\pm 1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ dilapisi emas murni (*coating*) yang akan berfungsi sebagai penghantar. Penampang melintang dan permukaan dari sampel diperbesar pada perbesaran tertentu. Selanjutnya dilakukan pembacaan dengan menggunakan SEM untuk mengetahui permukaan membran. Foto morfologi diperoleh berdasarkan hasil deteksi elektron yang dihamburkan atau berdasarkan elektron sekunder yang berasal dari permukaan sampel.

c. 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 ditetaskan 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 untuk meminimalisasi *experimental error* dan memperoleh nilai rata-rata. Hasil uji membran nanokomposit dengan variasi konsentrasi dibandingkan.

d. *Tensile strength*

Pengukuran *tensile strength* dengan instrumen UCT series (dumbbell ISO 527-2-5B) yang bertujuan untuk mengetahui kekuatan mekanik membran ketika diberikan gaya. *Stress* adalah hasil bagi gaya perluas area. *Strain* adalah rasio $\Delta l/l_0$ dimana Δl adalah perubahan panjang sedangkan l_0 adalah panjang awal sampel. 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 membran nanokomposit dengan variasi konsentrasi dibandingkan

e. Porositas Membran

Porositas (P) membran diukur dengan menggunakan metode *dry-weight-dry*. Biasanya, membran pertama kali direndam dalam air deionisasi (25°C, 24 jam). Air di permukaan kemudian dikeringkan dengan kertas saring dan membran ditimbang. Membran selanjutnya dikeringkan (50°C, 24 jam) sebelum massa keringnya ditimbang lagi. (Khoerunnisa *et al.*, 2020). Porositas membran kemudian dihitung menggunakan persamaan 3.2

$$P = \frac{\frac{w_w - w_d}{\rho_w}}{\frac{w_w - w_d}{\rho_w} + \frac{w_d}{\rho_p}} \times 100\% \quad (3.2)$$

W_w = berat membran basah (g)

W_d = berat membran kering (g)

ρ_w = densitas air (g/cm³)

ρ_p = densitas polimer (g/cm³).

3.4.3 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian anti-bakteri biasanya dilakukan dengan 2 jenis bakteri yaitu bakteri gram negatif dan bakteri gram positif. Perbedaan kedua jenis bakteri tersebut dapat menghasilkan respon yang berbeda terhadap suatu agen anti-bakteri. Bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) dan *Escherichia coli* (gram negatif) adalah bakteri yang umum digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri dalam bidang membran filtrasi. Kedua bakteri tersebut merupakan bakteri patogen yang sering menyebabkan fouling pada membran filtrasi dan kerap dijumpai pada limbah perkotaan. Cara membedakan bakteri ini dapat dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan H.C.J. Gram. Bakteri yang berwarna biru-keunguan saat diwarnai dengan pewarna kristal violet dan dibilas dengan etanol adalah bakteri gram positif, sedangkan bakteri gram negatif warnanya akan hilang saat dibilas dengan etanol. Perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan komposisi dinding sel kedua jenis bakteri (Langeler, Gerhat, & Schlegel, 1999; Satish & Aprana, 2014).

a. Metode cincin inhibisi

Membran PES/Kitosan-Amonium Klorida 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 ammonium klorida.

b. Total Plate Counting (TPC)

Membran komposit PES/Kitosan-Amonium Klorida dibuat persegi 2x2 cm. Membran sebayak diletakan dalam tabung reaksi steril berisi 29 mL larutan nutrient broth. Kemudian ditambahkan 1 mL suspensi bakteri 0,5 OD (*E. Coli* dan *S. Aureus*), dicampurkan (*shaker*) selama 12 jam. Kedalam tabung ulir, 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 1ml 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 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.