

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan dari bulan April sampai dengan bulan September 2013 di Laboratorium Kimia Riset Material dan Makanan serta di Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Uji karakterisasi morfologi permukaan di Laboratorium fisika Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Mineral dan Batubara Kementerian Energi dan Sumber Daya Mineral (tekMira) Bandung dan Uji kristalinitas dilakukan di Laboratorium fisika Pusat Survey Geologi (PSG) Bandung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat gelas, neraca analitik, blender, oven, corong buchner, pengaduk magnetik, pisau pemotong, wadah fermentasi, panci aluminium, kompor, buret 50 mL, botol vial, pemanas listrik, *rotary vacuum evaporator*, kaca arloji, saringan 100 mesh dan sentrifugator. *Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy* Shimadzu, *X-Ray Diffraction (XRD)*, *Scanning Electron Microscope (SEM)* .

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah limbah kulit nanas yang didapatkan dari penjual buah nanas yang berada di depan kampus Universitas Pendidikan Indonesia. Bahan lainnya yang digunakan adalah gula pasir, air, urea ((NH₂)₂CO) (E.Merck), alkohol 95%, NaOH 1% (E.Merck), CH₃COOH glasial (E.Merck), Asam sulfat (H₂SO₄) pekat (E.Merck), kertas

koran, karet pengikat, indicator universal, kertas saring *whatmann* dan membrane semipermeabel (Cellu-Sep®; MWCO 12,000-14,000) yang didapatkan dari Membrane Filtration Products, Inc. (TXS,USA).

3.3 Tahapan Penelitian

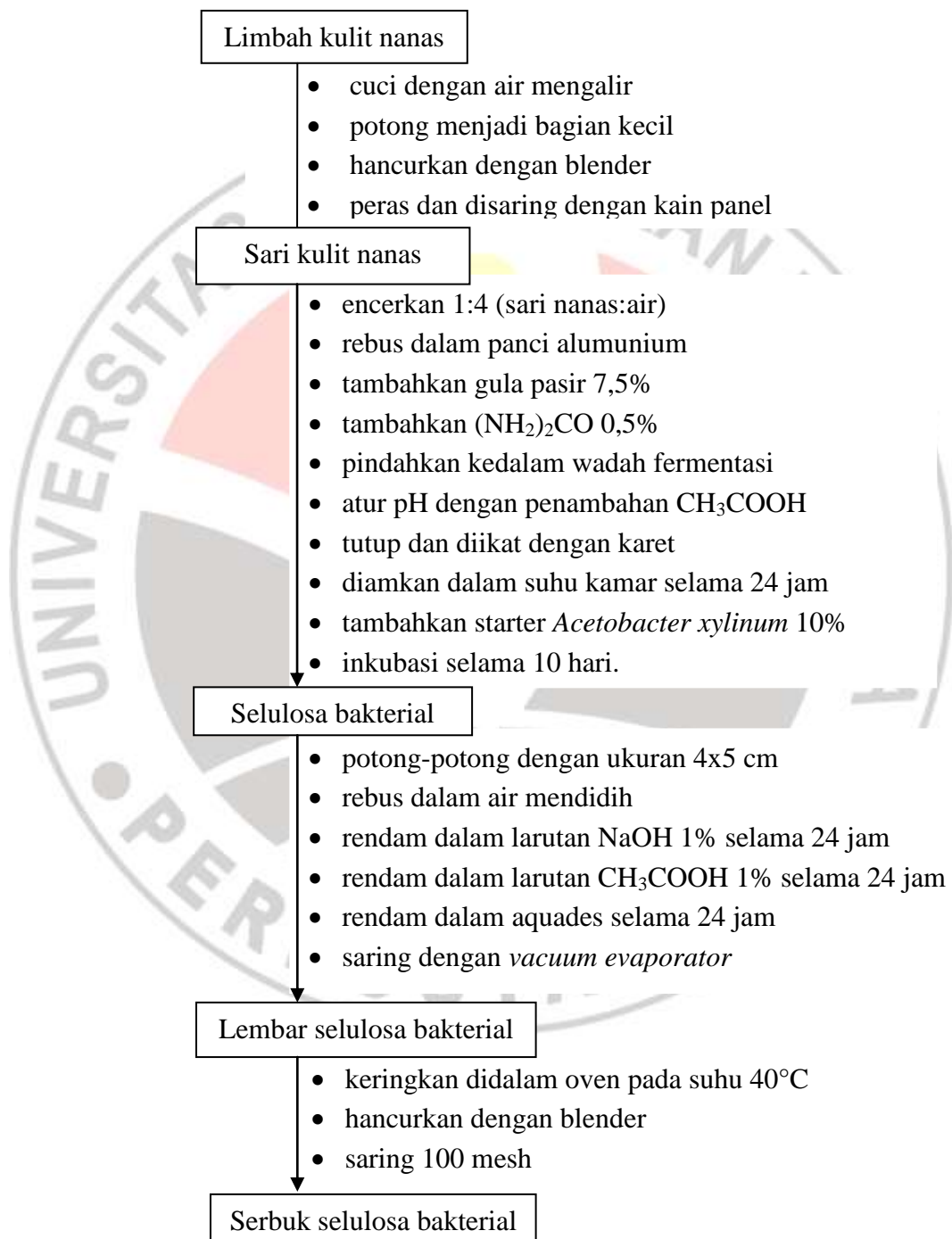
Prosedur penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap yakni :

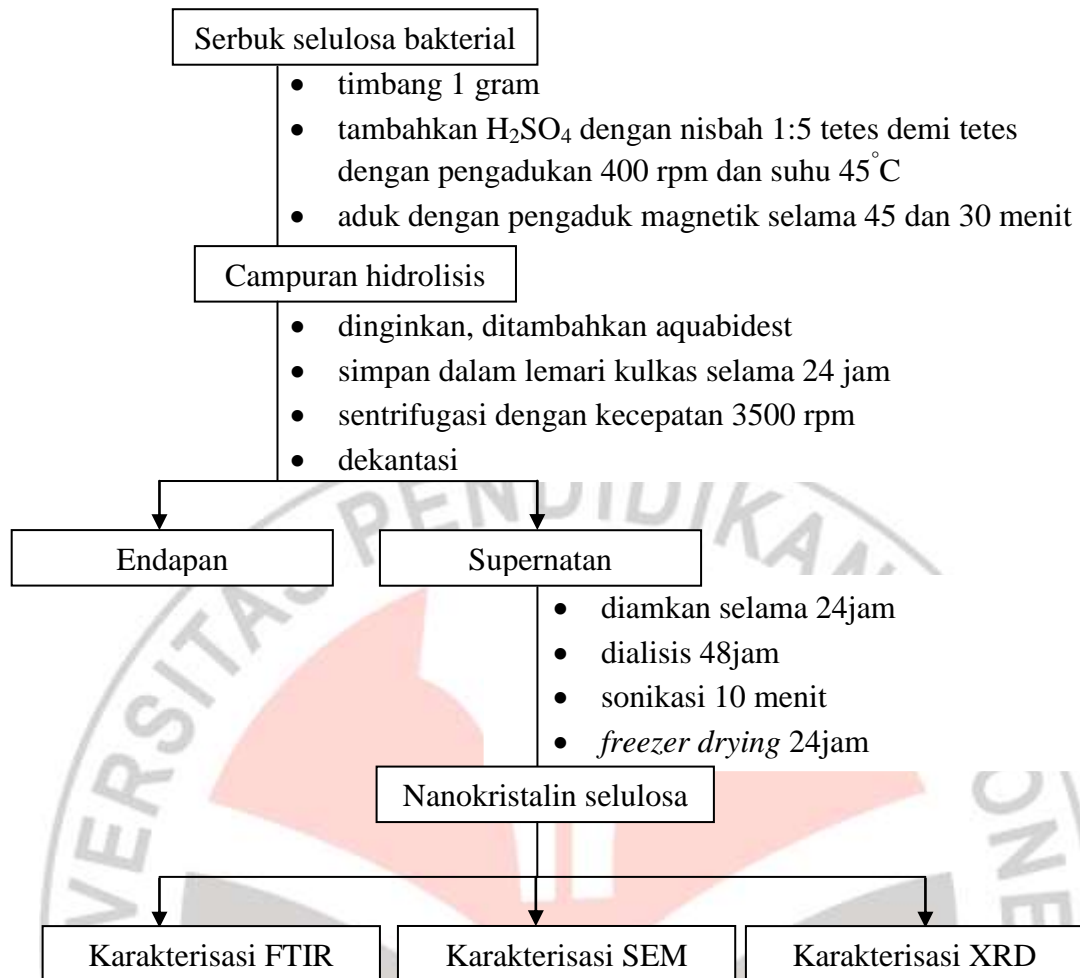
1. Tahap Preparasi Selulosa Bakterial
 - a. Tahap pembuatan sari kulit nanas
 - b. Tahap sintesis selulosa bakterial (Susanto *et al* 2000)
 - c. Tahap pemurnian selulosa bakterial (Safriani, 2000)
2. Tahap Isolasi Nanokristalin Selulosa
 - a. Tahap hidrolisis asam
 - b. Tahap sentrifugasi
 - c. Tahap dialisis
 - d. Sonikasi
 - e. *Freeze drying*
3. Tahap karakterisasi gugus fungsi menggunakan *Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy*, bentuk morfologi permukaan, ukuran, dan struktur menggunakan *Scanning Electron Microscopy (SEM)*, uji kristalinitas dengan menggunakan *Diffraction X-Ray (XRD)*

3.4 Bagan Alir Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi lima tahapan, yaitu dimulai dari tahap preparasi sampel selulosa bakterial yang terdiri dari 3 proses yakni pembuatan sari kulit nanas, sintesis selulosa bakterial sesuai dengan prosedur susanto *et al.* 2000, dan pemurnian selulosa selulosa bakterial sesuai dengan prosedur safriani *et al.*, 2000. Tahap kedua yakni isolasi nanokristalin selulosa yang terdiri dari 5 tahapan proses yang dilakukan seperti hidrolisis dengan asam kuat, sentrifugasi, dialisis, sonikasi, dan *freeze drying*. Selanjutnya tahapan karakterisasi yaitu analisis gugus fungsi menggunakan *Fourier Transform Infra Red Spectroscopy (FTIR)*, uji

morfologi permukaan menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), dan uji kristalinitas dengan menggunakan *Diffraction X-Ray* (XRD). Bagan alir penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.





Gambar 3.1. Bagan alir penelitian

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Tahap Preparasi Selulosa Bakterial

3.5.1.1 Pembuatan Sari Limbah Kulit Nanas

Pembuatan sari limbah kulit nanas meliputi pencucian kulit nanas dengan menggunakan air bersih yang mengalir, penghancuran dengan menggunakan blender, pemerasan dan penyaringan dengan menggunakan kain panel.

3.5.1.2 Pembuatan Selulosa Bakterial *Nata de pina* (Susanto *et al.* 2000)

Sari kulit nanas diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Pengenceran digunakan dengan perbandingan nanas:air (1:4)

total larutan 600ml. Larutan direbus sampai mendidih, lalu ditambahkan gula pasir 7,5% (b/v) dan urea ((NH₂)₂CO) 0.5% (b/v). Larutan dipindahkan kedalam wadah fermentasi dan diatur pH-nya menjadi 4.5 dengan penambahan asam asetat glasial (CH₃COOH). Wadah langsung ditutup dengan kertas koran yang telah disterilisasi dan diikat dengan karet, kemudian dibiarkan selama semalam pada suhu kamar. Penambahan inokulum sebanyak 10% (v/v) dilakukan apabila medium telah benar-benar dingin dan diinkubasikan pada suhu kamar maksimal selama 10 hari.

3.5.1.3 Pemurnian Selulosa Bakterial *Nata de pina* (Safriani, 2000)

Selulosa bakterial dipotong-potong dengan ukuran sekitar 4x5 cm. Potongan BC direbus selama ±20 menit. Setelah itu, direndam dalam larutan NaOH 1% (v/v) pada suhu kamar selama 24 jam, kemudian diganti rendamannya dengan larutan CH₃COOH glasial 1% (v/v) selama 24 jam.

Selulosa bakterial dicuci beberapa kali dengan aquades berulang-ulang, kemudian disaring dengan menggunakan *vacuum evaporator* untuk menarik air sampai diperoleh lembaran selulosa bakterial yang tipis. Lembaran ini dikeringkan didalam oven pada suhu 40°C. Lembar BC yang telah kering kemudian dihancurkan dengan blender, disaring menggunakan saringan 100 mesh didapatkan serbuk selulosa bakterial.

3.5.2 Isolasi Nanokristalin Selulosa

Isolasi nanokristalin selulosa dengan bahan baku selulosa bakterial yang dihasilkan melalui, hidrolisis menggunakan asam kuat H₂SO₄, proses sentrifugasi, dialisis, sonikasi, dan *freeze drying*.

3.5.2.1 Hidrolisis Asam

Aquades 40 ml ditambahkan kedalam 1 gram serbuk selulosa, kemudian diaduk dengan kecepatan 400 rpm dan suhu 45 °C. Setelah 10 menit, H₂SO₄ pekat ditambahkan tetes demi tetes dengan suhu dan kecepatan yang tetap. Campuran diaduk selama 45 menit dan 30 menit dihitung mulai dari tetes H₂SO₄ terakhir.

3.5.2.2 Proses Sentrifugasi

Tahapan pemisahan dilakukan melalui proses sentrifugasi. Hasil hidrolisis dimasukkan ke dalam aquabidest 500 mL disimpan dalam lemari pendingin selama 24 jam. Hasil hidrolisis disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm dan dilakukan pencucian endapan hasil sentrifugasi secara berulang-ulang dengan menggunakan aquadest. Supernatan yang diperoleh ditampung ke dalam gelas kimia.

3.5.2.3 Dialisis

Supernatan yang didapatkan dari hasil sentrifugasi dibiarkan selama 24jam. Supernatan didekantasi setelah itu dimasukkan ke dalam membran dialisis dan rendam dalam 100 ml air deionisasi selama 48jam.

3.5.2.4 Sonikasi

Supernatan yang telah didialisis selama 48 jam ditampung dalam botol vial. Selanjutnya disonikasi selama 10 menit.

3.5.2.5 Freeze Drying

Supernatan yang telah disonikasi selama 10 menit, selanjutnya diuapkan pelarutnya untuk mendapatkan padatan nanokristalin selulosa didalam alat *freeze drying*.

3.5.3 Analisis Gugus Fungsi

Analisis awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah analisis gugus fungsi pada bahan baku selulosa bakterial dari kulit nanas dengan menggunakan *Fourier Transform Infra Red (FTIR) Spectroscopy*. Analisis ini bertujuan untuk memastikan bahwa telah terbentuk selulosa bakterial. Selain itu analisis gugus fungsi ini juga diperlukan untuk adanya gugus fungsi yang hilang dan terbentuk setelah proses hidrolisis. Uji karakterisasi gugus fungsi menggunakan FTIR Shimadzu dengan sampel selulosa bakterial sebelum dan setelah dihidrolisis. Uji gugus fungsi menggunakan FTIR dilakukan dilaboratorium instrumen Universitas Pendidikan Indonesia (lampiran 2).

3.5.4 Analisis Morfologi Permukaan

Karakterisasi morfologi permukaan dilakukan dengan menggunakan alat *Scanning Electron Microscope (SEM)*. Analisis *Scanning Electron Microscope (SEM)* dilakukan untuk mengetahui gambaran morfologi permukaan dan ukuran partikel selulosa setelah dihidrolisis. Uji morfologi permukaan dilakukan pada sampel selulosa bakterial dan partikel selulosa setelah dilakukan hidrolisis pada waktu 30 dan 45 menit. Uji SEM ini dilakukan dilaboratorium pengujian Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Mineral dan Batubara (tekMira).

3.5.5 Uji Kristalinitas

Uji kristalinitas nanokristalin selulosa hasil hidrolisis selama 30 dan 45 menit dilakukan dengan menggunakan alat *X-Ray Diffraction (XRD)*. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui derajat kristalinitas partikel selulosa yang diperoleh. Uji kristalinitas ini dilakukan di laboratorium fisika Pusat Survey Geologi (PSG) Bandung. (lampiran 4)