

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 ALAT DAN BAHAN

3.1.1 Alat penelitian

A. Alat Sintesis

pH meter, *incubator*, aluminium foil, mikropipet, *stopwatch*, gelas *beaker*, gelas ukur, *hotplate stirrer*, *magnetic stirrer oven mummer*, spatula, gunting, tabung reaksi, *cawan petri*, *laminar air flow*, penggaris, *bunsen spiritus*, wadah penumbuhan bakteri, pengaduk kaca, wadah perendaman uji *swelling*.

B. Alat Karakterisasi

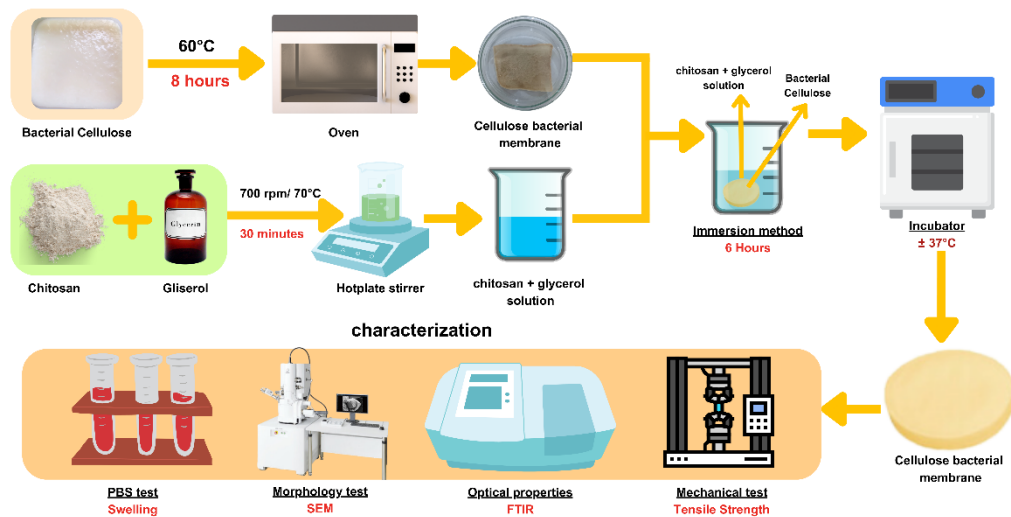
1. *Scanning electron microscope* (Jeol, JSM- IT200) Lab *scanning electron microscope* MERO Foundation
2. *Fourier Transform InfraRed* (Perkin-Elmer UATR Spectrum Two) Lab Terpadu Universitas Diponegoro
3. *Tensile Strength Testing Machine* Lab Terpadu Universitas Diponegoro
4. Neraca Analitik, Lab *Basic Science* Intitut Teknologi Telkom Purwokerto.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah membran selulosa bakteri-kitosan dan penambahan gliserol sebagai kandidat *wound dressing* yaitu ; Gliserol 85% dari *brand: Merck cataloge number* 1.0409094.1000, *Acetobacter xylinum* hasil peremajaan *acetobacter nata de coco* 0,5L *liquid bacterial statrter* yang di produksi oleh *Biotecno*, NaOH (*Sodium Hydroxide*) dengan *pallets for analysis.*, asam asetat glasial 100, Za *Food Grade- Zwalwezuur Ammonium*, Kitosan (*Chitosan Pharma Grade*), sukrosa, air kelapa, *Phosfat Buffer Saline* (PBS) Nita Kimia *for the laboratory Needs*, kertas saring, sarung tangan, label, Tisu, alkohol 70%, aquades dari *Laboratory supplier* (CV. Kimia Jaya Labora).

3.2 PROSEDUR PENELITIAN

Tahapan dalam Pelaksanaan penelitian pembuatan *biocomposit* selulosa bakteri-kitosan dengan penambahan gliserol sebagai kandidat *wound dressing* terdiri dari fabrikasi membran biokomposit selulosa bakteri-kitosan dan gliserol dan karakterisasi atau pengujian membran biokomposit selulosa bakteri-kitosan dan gliserol.



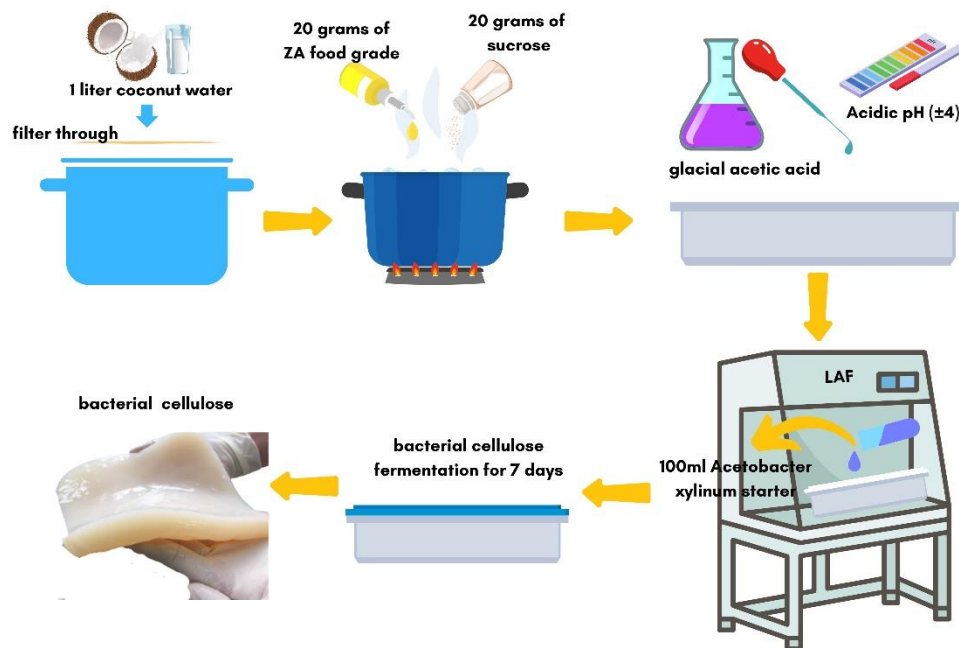
Gambar 3.1 Prosedur Penelitian

3.2.1. Fabrikasi membran biokomposit bakteri selulosa kitosan dan gliserol

3.2.1.1 Sintesis selulosa menggunakan bakteri *Acetobacter xylinum*.

Selulosa bakteri diproduksi dengan memfermentasi bakteri *Acetobacter xylinum* dalam media air kelapa. *Acetobacter xylinum* yang digunakan dari Laboratorium *Mikrobiologi* Institut Teknologi Telkom Purwokerto. Langkah di awali dengan menggunakan bakteri yang di dapatkan dari media air kelapa, yang selanjutnya menyaring air kelapa dan panaskan larutan air kelapa hingga mendidih, sambil kemudian menambahkan Za dan Sukrosa masing-masing 20 gram. Setelah larutan mendidih, kemudian Za dan sukrosa yang telah di timbang dimasukkan kedalam air kelapa yang sudah mendidih, kemudian aduk kembali dengan memastikan larutan Za dan sukrosa benar-benar larut. Mendinginkan dan dilakukan penambahan asam asetat sampai dengan pH sekitar 4.

Setelah pH mencapai pH 4 kemudian dapat menambahkan starter *Acetobacter xylinum*, difermentasi selama 1 minggu, proses fermentasi harus di cek secara berkala untuk memastikan bakteri selulosa tumbuh sesuai dengan ketebalan yang diinginkan yaitu sekitar 0.5 – 1 cm dan dicuci menggunakan akuades beberapa kali, setelah itu dilakukan perendaman dengan NaOH selama 24 jam kemudian di cuci kembali dengan akuades untuk selanjutnya dikeringkan [11].



Gambar 3.2 Prosedur pembuatan bakteri selulosa

3.2.1.2 Proses pemotongan dan pengeringan bakteri selulosa

Proses pengeringan selulosa bakteri yang telah tumbuh melibatkan pemotongan membran menjadi dua panjang berbeda, yaitu 7 cm dan 5 cm, yang kemudian dibagi menjadi empat bagian. Setelah itu, potongan-potongan tersebut ditempatkan dalam cawan petri untuk menjalani proses pengeringan menggunakan oven *mummer* yang terdapat di laboratorium mikrobiologi IT Telkom Purwokerto. Proses pengeringan dilakukan selama 8 jam dengan suhu oven set pada 60°C, sementara pengecekan secara berkala dilakukan untuk memastikan hasil yang diinginkan tercapai.

3.2.1.3 Pembuatan variasi konsentrasi larutan kitosan

Langkah awal dilakukan dengan menyiapkan larutan kitosan yang memiliki variasi konsentrasi, yaitu 1% (m/v), 3% (m/v), dan 5% (m/v), dengan masing-masing 1 gram, 3 gram, dan 5 gram kitosan yang dilarutkan dalam 100 ml asam asetat. Proses persiapan melibatkan penimbangan serbuk kitosan menggunakan neraca analitik untuk mencapai jumlah yang sesuai. Setelah itu, larutan kitosan secara perlahan dimasukkan ke dalam gelas beker yang berisi asam asetat, dan kemudian dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer* selama 30 menit, dalam proses menghomogenkan menggunakan *hotplate stirrer* suhu *hotplate* sekitar $\pm 80^{\circ}\text{C}$ [8].

3.2.1.4 Penambahan gliserol

Setelah dilakukan pembuatan larutan kitosan dengan variasi yang telah ditentukan, langkah selanjutnya adalah mengukur 5 ml larutan gliserol. Larutan gliserol ini kemudian dicampurkan ke dalam masing-masing variasi larutan kitosan yang telah disiapkan. Proses selanjutnya melibatkan pengadukan larutan menggunakan *hotplate stirrer* hingga mencapai keadaan homogen.

3.2.1.5 Perendaman dan pengeringan selulosa bakteri kedalam larutan kitosan dan gliserol

Membran selulosa bakteri yang telah terbentuk dari bakteri *acetobacter xylinum* yang terbentuk sebelumnya kemudian diimersiakan atau dilakukan perendaman kedalam larutan masing-masing variasi kitosan dengan penambahan gliserol selama 6 jam [8]. Pada saat proses perendaman pastikan seluruh bagian dari membran bakteri selulosa dapat terendam semua kedalam larutan kitosan dan gliserol. Setelah 6 jam sampel kemudian di angkat dan diletakkan kedalam cawan petri untuk kemudian dimasukkan kedalam inkubator dengan suhu $\pm 37,5^{\circ}\text{C}$ sampai membran bakteri selulosa kering [8]. Proses setelah didapatkan membran bakteri selulosa yang kering kemudian akan dilakukan pengujian menggunakan FTIR, *Tensile strength*, SEM dan *Swelling test*.

3.2.2. Karakterisasi Membran BC-Kitosan gliserol sebagai *Wound Dressing*

Dalam penelitian mengenai potensi membran bakteri selulosa sebagai kandidat *wound dressing* untuk penanganan luka neuroiskemik pada penderita diabetes melitus, beberapa tahap pengujian telah dilakukan. Pengujian tersebut melibatkan Uji FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) untuk analisis struktur kimia membran, Uji SEM (*Scanning Electron Microscope*) guna mengevaluasi morfologi permukaan membran, Uji Mekanik (*Tensile Strength*) untuk menilai kekuatan mekanik membran, serta Uji Pembekakan (*swelling*) untuk memahami respons membran terhadap pembekakan.

3.2.2.1 Uji *Fourier Transform InfraRed* (FTIR)

Uji ini bertujuan untuk menganalisis keberadaan gugus fungsi dan melihat apakah hanya ada ikatan kimia atau fisika. Dengan memeriksa penyerapan radiasi *infrared* pada berbagai panjang gelombang. Sampel dicirikan dengan *spektroskopi* inframerah yang berasal dari sinar laser yang dipantulkan dari sebuah prisma. Sampel yang dilakukan pengujian dipotong dan di timbang dengan berat 1 gram yang dipotong kecil-kecil berukuran 0,1 sampai 1 mm. Sampel diuji spektrum inframerah pada bilangan gelombang dari 4000 cm^{-1} hingga 500 cm^{-1} . Analisis nilai absorbansi dan identifikasi puncak pada spektrum untuk mengidentifikasi gugus kompleks yang terdapat pada sampel membran [11].



Gambar 3.3 Alat FTIR : *Perkin-Elmer UATR Spectrum Two* [58]

3.2.2.2 Uji Mekanik (Uji Tarik)

Salah satu pengujian dalam penelitian ini yaitu uji tarik. Tujuan pemantauan sifat mekanik dilakukan dengan cara memotong sampel dengan Panjang 5cm dan lebar 1cm. Setelah itu dilakukan pengukuran ketebalan pada membran. Pengujian tarik dilakukan dengan terlebih dahulu mencetak sampel sesuai standar yang digunakan kemudian menariknya hingga putus. Sampel dicetak dalam ukuran standar untuk menguji sampel polimer yang dipotong agar sesuai dengan cetakan atau halter. Pasang penguji tarik ke kedua ujung sampel dan terapkan gaya tarik berlawanan ke kedua ujung sampel sampai sampel putus. Setelah itu dicatat perbedaan antara Panjang dan tebal membran yang akan diuji sehingga didapatkan nilai F_{maks} , untuk kemudian dilakukan perhitungan dan di analisa [21].



Gambar 3.4 Alat Uji Tarik (*Tensile Strength*) [21]

Pengujian tarik merupakan metode efektif untuk menilai kekuatan tarik dan persentase elongasi pada setiap sampel, memungkinkan pemahaman mendalam terkait daya tahan dan kelenturan material. Uji ini memberikan informasi tentang seberapa kuat setiap sampel dapat menahan tekanan hingga mencapai titik putusnya, sementara persentase elongasi menggambarkan sejauh mana material dapat meregang sebelum mengalami deformasi permanen.

3.2.2.3 Uji *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Salah satu uji morfologi untuk suatu sampel, dalam hal ini membran kitosan dari pembalut luka yang mengandung gliserol, dilakukan dengan menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM). Proses pengujian morfologi ini memanfaatkan mikroskop elektron pemindaian untuk mengkonfirmasi berbagai aspek struktural, seperti struktur permukaan, ukuran pori, serta lapisan berpori dan tidak berpori pada membran kitosan. Sebagai langkah tambahan, dilakukan proses *coating* dengan logam Au (emas) dengan tujuan agar hasil pengamatan sampel menggunakan SEM menjadi lebih jelas, terutama dalam mencari detail pori atau struktur permukaan yang menjadi fokus penelitian. *Coating* ini juga memiliki fungsi untuk mencegah kerusakan pada permukaan sampel selama proses pengamatan [21].



Gambar 3.5 Alat *Scanning Electron Microscope*; Jeol, JSM- IT200

Dalam penelitian ini uji SEM bertujuan untuk meng-karakterisasi secara detail struktur mikro dan distribusi partikel dalam biokomposit, memberikan pemahaman mendalam tentang sifat-sifat berskala mikro yang dapat memengaruhi kinerja makro material tersebut. Penggunaan SEM juga memberikan kesempatan untuk melihat bagaimana tekstur permukaan, ketebalan dan juga pori dari material yang diuji. Dengan ini dapat melihat bagaimana perbandingan antara tekstur, ketebalan dan pori-pori material yang satu dengan material yang lainnya.

3.2.2.4 Uji *Swelling*

Perhitungan pembengkakan (*swelling*) dilakukan untuk mengetahui kemampuan menyerap eksudat pada permukaan luka dan menyediakan lingkungan luka agar tetap lembap. Perhitungan ini dilakukan dengan merendam sampel membran dengan berbagai variasi kitosan yang telah diperkuat dengan penambahan *plasticizer* gliserol dalam larutan *Phosphate Buffer Saline* dengan pH 7. Sebelumnya, sampel membran dengan variasi kitosan + gliserol harus di preparasi terlebih dahulu dengan memotong sampel membran dengan ukuran kecil sekitar 1×1 cm yang berbentuk persegi. Berat kering membran dengan berbagai variasi kitosan yang telah diperkuat dengan penambahan *plasticizer* gliserol. Setelah itu, catat berat sampel pada interval waktu 1 menit selama pengujian perendaman. Perhitungan dilakukan untuk menentukan persentase pembengkakan yang terjadi pada membran bakteri selulosa [61].

$$DS = \frac{W_o - W_t}{W_o} \times 100 \% \quad (3.1)$$

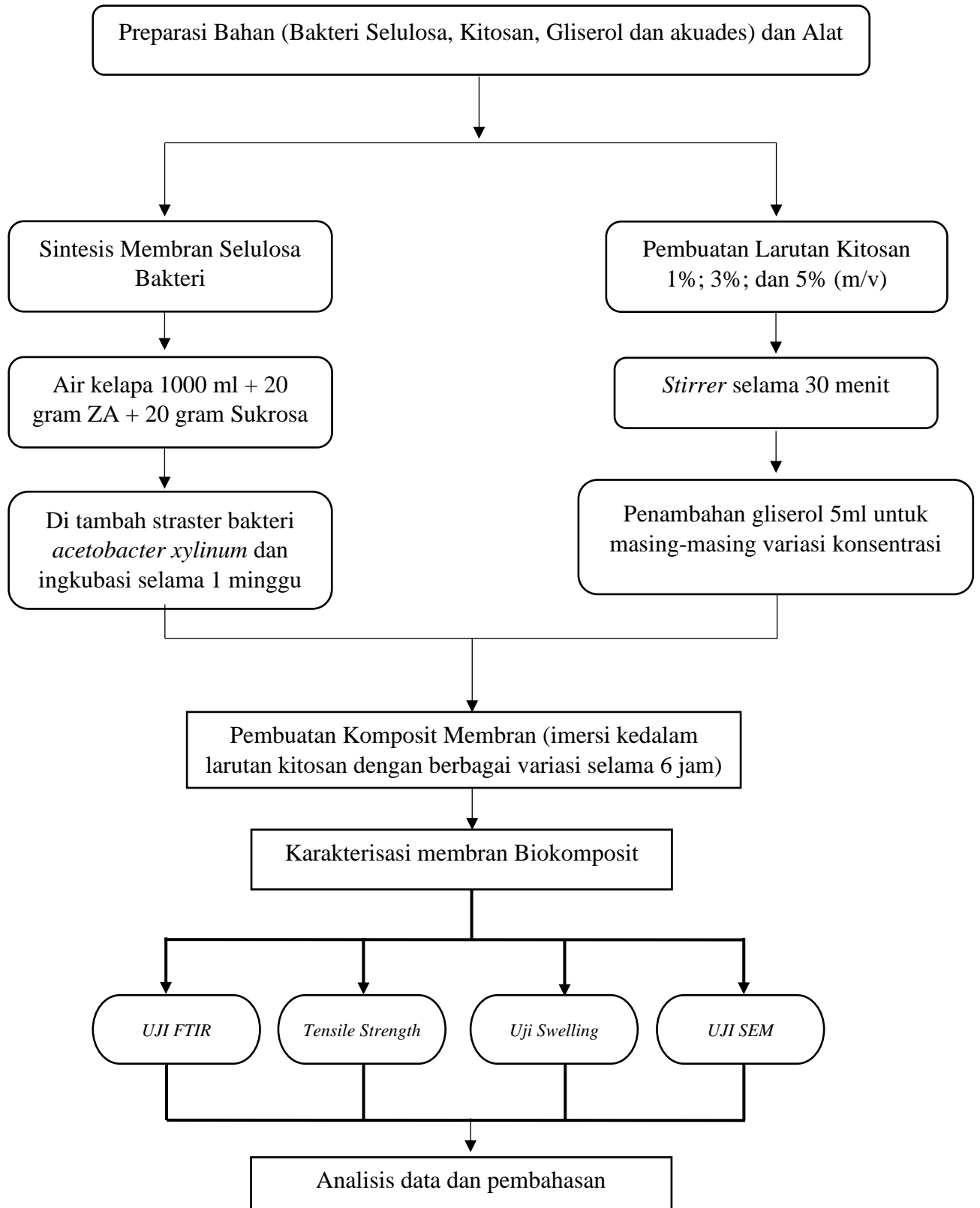
Keterangan :

DS = Rasio *Swelling*

W_t = berat akhir membran setelah dilakukan perendaman pada PBS

W_o = berat awal pada keadaan kering

3.3 SKEMA PENELITIAN



Gambar 3.6 Skema Penelitian