

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian “Pengaruh variasi metode biokomposit selulosa bakteri kitosan dalam pembentukan material *hydrogel* untuk aplikasi implant medis” pada Tabel 3.1 sebagai berikut

**Tabel 3. 1 Alat dan Bahan Penelitian**

Keterangan	Alat	Bahan
Fermentasi selulosa bakteri	Neraca digital, gelas beaker, panci, saringan, kompor listrik, wadah fermentasi, <i>Laminar Air Flow</i> (LAF), kertas buram, dan solatip	Air kelapa, <i>ZA food grade</i> , sukrosa, asam asetat, starter bakteri <i>Acetobacter xylinum</i> , NaOH, dan <i>aquades</i>
Pembuatan <i>slurry</i> SB	<i>blender</i> , kertas saring whattman, Erlenmeyer, corong kaca, gunting, wadah penyimpanan, dan lemari es	Selulosa bakteri hasil fermentasi dan <i>aquades</i>
Pembuatan larutan kitosan; gliserol; dan <i>glutaraldehyde</i>	Neraca digital, gelas beaker, gelas ukur, pipet tetes, <i>vial bottle</i> , <i>magnetic stirrer</i> , <i>hotplate</i> , spatula, dan <i>aluminium foil</i>	Kitosan, asam asetat, gliserol, <i>glutarldehyde</i> , dan <i>aquades</i>
Sintesis <i>hydrogel</i>	Neraca digital, gelas beaker, <i>aluminium foil</i> , <i>magnetic stirrer</i> , <i>hotplate</i> , spatula, dan <i>pot tube</i> 100 ml	<i>Slurry</i> SB, larutan kitosan, larutan gliserol, dan larutan <i>glutarldehyde</i>
Pengujian FTIR	Plastik <i>ziplock</i> , <i>Freezer box</i> , Biobase Lab Field Vacuum Freeze Drying Machine Freeze Dry, dan Alat FTIR Perkin-Elmer UATR	<i>Hydrogel</i> SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan <i>glutaraldehyde</i>

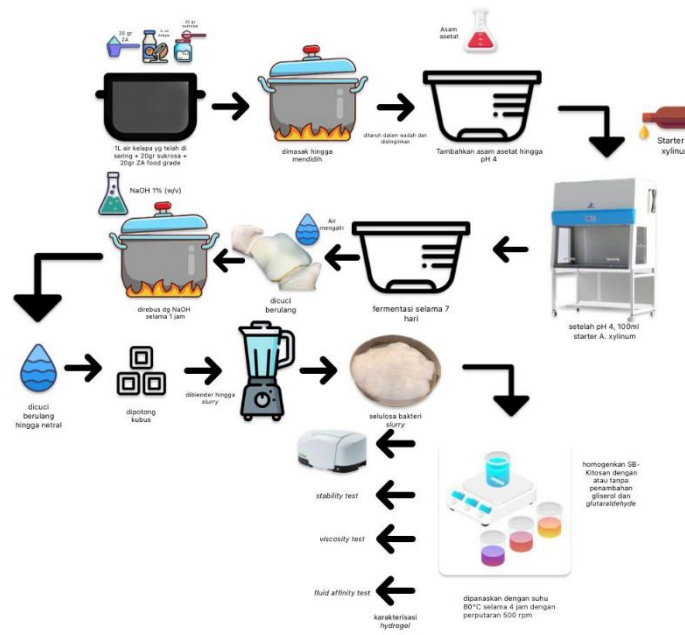
	Spectrum Two	
<i>Stability test</i>	POT tube ukuran 5 mL, kertas pH, Inkubator, lemari es, tabung sentrifugasi 15 mL dan <i>centrifuge machine</i>	<i>Hydrogel</i> SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan <i>glutaraldehyde</i>
<i>Viscosity test</i>	Gelas beaker dan Viscometer Brookfield Ametek	<i>Hydrogel</i> SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan <i>glutaraldehyde</i>
<i>Fluid affinity test</i>	Syringe 50 mL, <i>aluminium foil</i> , Inkubator, <i>magnetic stirrer</i> , <i>hotplate</i> , <i>autoclave</i> , <i>cutter</i> , dan Neraca digital	<i>Sodium chloride</i> , <i>calcium chloride</i> , <i>aquades</i> , media nutrient agar, gelatin bloom 160 dan <i>Hydrogel</i> SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan <i>glutaraldehyde</i>

Alat yang digunakan pada proses fermentasi selulosa bakteri, yaitu neraca digital, gelas beaker, saringan, kompor listrik, wadah fermentasi, LAF, kertas buram dan solatip. Alat yang digunakan pada pembuatan *slurry* SB, yaitu *blender*, kertas saring Whattman, erlenmeyer, corong kaca, gunting, wadah penyimpanan, dan lemari es. Alat yang digunakan pada proses pembuatan larutan kitosan; gliserol; *glutaraldehyde*, yaitu neraca digital, gelas beaker, gelas ukur, pipet tetes, *vial bottle*, *magnetic stirrer*, *hotplate*, spatula, dan *aluminum foil*. Alat yang digunakan pada proses sintesis *hydrogel*, yaitu neraca digital, gelas beaker, *aluminium foil*, *magnetic stirrer*, *hotplate*, spatula, dan *pot tube* 100 mL. Alat untuk preparasi FTIR menggunakan, plastik *ziplock*, *Freezer box*, Biobase Lab Field Vacuum Freeze Drying Machine Freeze Dry, sementara alat untuk pengujian FTIR menggunakan, Perkin-Elmer UATR Spectrum Two. Alat yang digunakan pada *stability test*, yaitu *pot tube* 5 mL, kertas pH, Inkubator, lemari es, tabung sentrifugasi 15 mL dan *centrifuge machine*. Alat yang digunakan pada *viscosity test*, yaitu gelas beaker dan Viscometer Brookfield Ametek. Alat yang digunakan pada *fluid affinity test*, yaitu Syringe 50 mL, *aluminium foil*, Inkubator, *magnetic stirrer*, *hotplate*, *autoclave*, *cutter*, dan neraca digital.

Bahan yang digunakan pada proses fermentasi selulosa bakteri dan pembuatan *slurry* SB, yaitu air kelapa, 20 gram ZA *food grade*, 20 gram sukrosa, asam asetat, starter bakteri *Acetobacter xylinum*, NaOH 1% (w/v), *aquades*, SB hasil fermentasi. Bahan yang digunakan pada proses pembuatan larutan kitosan; gliserol; dan *glutaraldehyde*, yaitu kitosan bubuk (udang) 2 gram, asam asetat PA 1%(v/v), 2 mL gliserol, 2 mL *glutaraldehyde*, dan *aquades*. Bahan yang digunakan pada proses sintesis *hydrogel*, yaitu *Slurry* SB, larutan kitosan 2% (w/v), larutan gliserol 2% (v/v), dan larutan *glutaraldehyde* 2% (v/v). Bahan yang digunakan pada proses karakterisasi FTIR, *stability test*, *viscosity test* adalah *Hydrogel* SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan *glutaraldehyde*. Sementara, *fluid affinity test*, terdapat bahan tambahan, yakni 8,29 *Sodium chloride*, 0,36 *calcium chloride*, *aquades*, 2 gram media nutrient agar, ±35 gram gelatin bloom 160 dan masing-masing 10 mL sampe *hydrogel* SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan *glutaraldehyde*.

### 3.2 PROSEDUR PENELITIAN

Penelitian berjudul “Pengaruh Variasi Metode Biokomposit Selulosa Bakteri Kitosan dalam Pembentukan Material *Hydrogel* untuk Aplikasi Implan Medis” dilakukan selama 6 bulan, terhitung dari Januari 2024 – Juni 2024. Pembuatan biokomposit SB-Kitosan hingga menjadi material *hydrogel* dilakukan di Laboratorium Basic Science dan Laboratorium Mikrobiologi Pangan Institut Teknologi Telkom Purwokerto, proses *freeze dry* dan *viscosity test* dilakukan di Laboratorium Fisika dan Instrumentasi Institut Teknologi Telkom Purwokerto. Sementara, karakteristik FTIR dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro. Prosedur penelitian ini terdiri dari fabrikasi biokomposit *hydrogel* SB-Kitosan dan karakterisasi material *Hydrogel* yang terbentuk.



Gambar 3. 1 Metode penelitian pembentukan material *hydrogel*

### 3.2.1 Fabrikasi Biokomposit Material *Hydrogel* Selulosa Bakteri-Kitosan

#### 3.2.1.1 Pembuatan Selulosa Bakteri *Slurry*

Penelitian ini menggunakan *Acetobacter xylinum* yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Institut Teknologi Telkom Purwokerto. Pertama-tama, panaskan 1000 mL air kelapa yang telah disaring, setelah hampir mendidih, masukan 20 gram ZA *food grade*, dan 20 gram sukrosa hingga mendidih. Setelah mendidih, tambahkan asam asetat hingga pH larutan 4. Kultur media didiamkan dalam wadah fermentasi hingga dingin. Kemudian, ditambahkan starter bakteri *Acetobacter xylinum*, lalu di fermentasi selama 1 minggu [64]. Setelah itu, nata yang terbentuk dicuci menggunakan *aquades* dan direbus NaOH 1% (w/v) selama 1 jam menggunakan kompor Listrik [65]. Tahap selanjutnya, dicuci berulang menggunakan *aquades*, lalu dipotong-potong dan di blender selama  $\pm 5$  menit hingga menjadi *uniform slurry*. SB yang berbentuk *slurry* kemudian di simpan di dalam lemari es pada suhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.1.2 Pembuatan Larutan Kitosan

Larutan kitosan 2% (w/v) dibuat dengan mempersiapkan 2 gram kitosan udang ke dalam 100 mL asam asetat 1% (v/v) [66]. Kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker lalu dipanaskan menggunakan *hotplate stirrer* selama  $\pm 6$  jam

hingga homogen [67]. Lalu, larutan kitosan 2% (w/v) disimpan ke dalam lemari es.

#### **3.2.1.3 Pembuatan Larutan Gliserol**

Pembuatan larutan gliserol 2% (v/v) dilakukan dengan mempersiapkan 2 mL gliserol murni ke dalam 98 mL aquades. Lalu dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer* selama  $\pm 30$  menit. Larutan larutan gliserol 2% (v/v) disimpan dalam lemari es.

#### **3.2.1.4 Pembuatan Larutan *Glutaraldehyde***

Pembuatan larutan *glutaraldehyde* 2% (v/v) dimulai dengan mencampurkan 2 mL *glutaraldehyde* (25% *solution in water*) ke dalam *aquades* hingga larutannya mencapai 100 mL. Kemudian, disimpan di dalam lemari es [66].

#### **3.2.1.5 Sintesis *Hydrogel* (SB-Kitosan)**

*Slurry* SB yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam gelas *beaker* dan ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak  $5,6 \pm 0,5$  gram dan dicampurkan sebanyak 16 mL larutan kitosan 2% (w/v), untuk kemudian dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer* selama 4 jam dengan suhu  $80 \pm 1^\circ\text{C}$  dengan perputaran 500 rpm [66].

#### **3.2.1.6 Sintesis *Hydrogel* (SB-Kitosan dengan penambahan gliserol)**

*Slurry* SB yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam gelas *beaker* dan ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak  $5,6 \pm 0,5$  gram dan dicampurkan sebanyak 16 mL larutan kitosan 2% (w/v) dan kemudian ditambahkan 1,5 mL gliserol untuk kemudian dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer* selama 4 jam dengan suhu  $80 \pm 1^\circ\text{C}$  dengan perputaran 500 rpm [66], [68].

#### **3.2.1.7 Sintesis *hydrogel* (SB-Kitosan dengan penambahan *glutaraldehyde*)**

*Slurry* SB yang telah dibuat kemudian dimasukkan ke dalam gelas *beaker* dan ditimbang menggunakan neraca digital sebanyak  $5,6 \pm 0,5$  gram dan dicampurkan sebanyak 16 mL larutan kitosan 2% (w/v) dan kemudian ditambahkan 1,5 mL *glutaraldehyde* untuk kemudian dihomogenkan

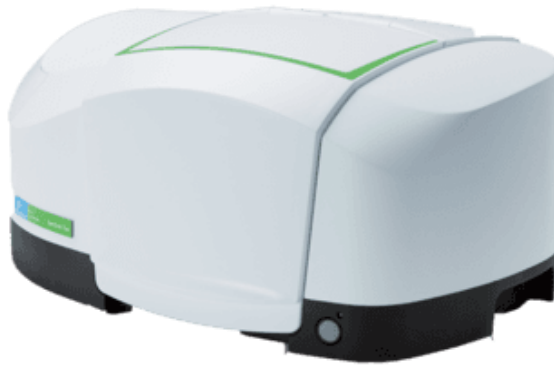
menggunakan hotplate stirrer selama 4 jam dengan suhu  $80\pm 1$  °C dengan perputaran 500 rpm [66], [68].

### **3.2.2 Karakterisasi Biokomposit *Hydrogel***

Pengujian (karakterisasi) yang dilakukan dalam penelitian ini ada beberapa tahap, meliputi *Fourier Transform InfraRed* (FTIR) yang dilakukan untuk mengidentifikasi gugus fungsi, *stability test* yang berfungsi untuk melihat perubahan fisik dan stabilitas kimia dari *hydrogel* yang terbentuk, *viscosity test* yang dilakukan untuk melihat perubahan viskositas pada *hydrogel* SB-Kitosan, dan *fluid affinity test* yang berfungsi untuk mengukur kemampuan *hydrogel* untuk menyerap dan berinteraksi dengan cairan, termasuk air dan cairan tubuh [63], [69].

#### **3.2.2.1 Uji *Fourier Transform InfraRed* (FTIR)**

Karakterisasi FTIR merupakan suatu teknik memperoleh spektrum inframerah dari penyerapan emisi dari sampel yang akan dianalisis yang bisa berupa padatan, cairan, atau gas [70]. Dari teknik tersebut, dapat diperoleh komponen apa yang ada di dalamnya, gugus fungsinya dan apa saja yang tercampur di dalam sampel, serta interaksi antar komponen di dalam sampel. Pada penelitian ini, digunakan alat FTIR Perkin-Elmer UATR Spectrum Two di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro Semarang. Masing-masing sampel *hydrogel* SB-Kitosan dengan atau tanpa penambahan gliserol dan *glutaraldehyde* dikeringkan menggunakan metode *freeze dry* menggunakan Biobase Lab Field Vacuum Freeze Drying Machine Freeze Dry di Laboratorium Fisika dan Instrumentasi Institut Teknologi Telkom Purwokerto. Sampel dimasukkan ke dalam plastic *ziplock* sebanyak  $15\pm 2$  mL tiap variasi sampel, lalu disimpan dalam *freezer box* di Laboratorium Basic Science Institut Teknologi Telkom Purwokerto dengan suhu  $\pm -18$ °C. Setelahnya, sampel akan dikeluarkan dari *ziplock* dan dilakukan pengeringan menggunakan metode *freeze dry*. Dengan keterbatasan alat yang digunakan, proses *freeze dry* dilakukan pembekuan (*freezing*) selama  $\pm 2$  jam dan pengeringan (*drying*) selama  $\pm 5$  jam dengan 3 kali pengulangan. Setelahnya, sampel diberi label nama dan dikirim untuk dilakukan pengujian FTIR pada bilangan gelombang  $4000-400$   $\text{cm}^{-1}$ .



**Gambar 3. 2 Alat FTIR[70]**

### **3.2.2.2 Stability Test**

*Stability test* pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui stabilitas fisik dan kimia pada material *hydrogel* yang telah terbentuk. Karakterisasi *stability test* pada penelitian ini menggunakan metode *freezeing-thawing* dimana sample akan di inkubasi selama 10 hari atau 5 siklus. Satu siklus pada pengujian ini terdiri dari 24 jam pada suhu 37°C (inkubator) dan 24 jam pada suhu 4°C (lemari es), lalu sampel diukur menggunakan pH meter. Stabilitas fisik pada karakterisasi ini, dilakukan menggunakan *centrifuge machine* dengan menambahkan  $\pm 1$  mL dari tiap sampel ke dalam *centrifuge tube* dan di sentrifugasi (3000 rpm) selama 30 menit pada suhu kamar (25°C) [69].

### **3.2.2.3 Viscosity Test**

Viskositas tiap sampel diuji menggunakan *viscometer* Brookfield dengan putaran spindle no. 64 dan kecepatan 50 rpm. Viskometer digunakan untuk menghitung rasio viskositas masing-masing gel dengan satu kondisi aliran. Sampel diukur dalam rangkap tiga untuk mendapatkan rasio viskositas[69].

### **3.2.2.4 Fluid Affinity Test**

*Fluid affinity test* pada penelitian ini dilakukan dengan mempersiapkan 18 buah *syringe* ukuran 50 mL yang kemudian dipot *tube tubeong nozzles*-nya dan larutan uji A yang mengandung 8,29 gram *sodium chloride* dan 0,36 gram *calcium chloride* lalu dimasukan ke dalam *aquades* hingga larutannya mencapai 1000 mL. Selanjutnya, substrat uji yang relatif lembab dilakukan dengan mencampurkan 2 gram agar yang ditambahkan dengan larutan uji A hingga mencapai total massa larutan 100 gram. Kemudian, wadah inkubasi disterilisasi menggunakan *autoclave*

pada suhu  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  untuk selanjutnya dibiarkan dingin hingga suhu  $60 \pm 5^\circ\text{C}$  sebelum digunakan lebih lanjut. Sementara, untuk substrat uji yang relatif kering dipersiapkan dengan menambahkan gelatin ke dalam 65 gram larutan uji A hingga mencapai massa total larutan 100 gram. Lalu, aduk larutan menggunakan *hotplate stirrer* selama 12 hingga 16 jam pada suhu  $60^\circ\text{C}$  untuk memastikan larutan homogen.

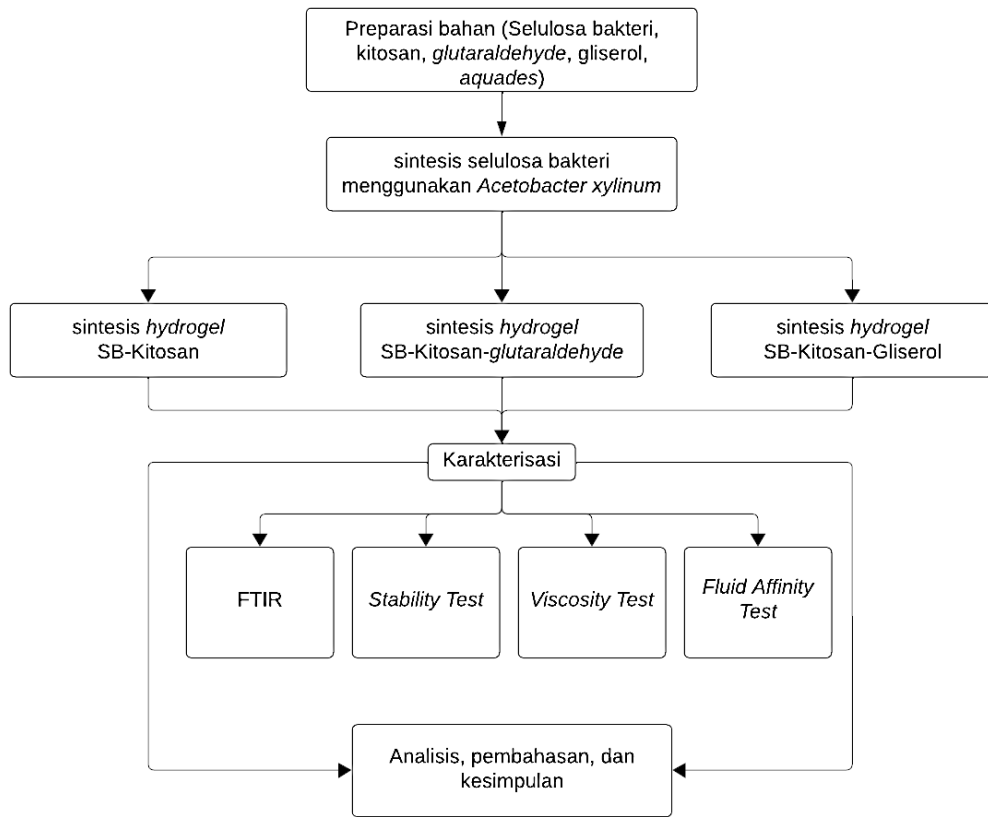
Kemudian, *plunger syringe* ditarik setinggi 30 ml. Kemudian, ditambahkan  $10 \pm 0,5$  gram agar atau gelatin ke dalam *syringe*, tutup ujung *syringe* yang terbuka dengan menggunakan *aluminium foil* (3 dengan agar dan 3 dengan gelatin untuk setiap sampel yang diuji). Selanjutnya, akan dilakukan penimbangan tiap *syringe* dengan substrat uji dan dicatat massanya (W1). Tambahkan  $10 \pm 0,5$  g sampel uji, dengan merata di atas permukaan agar atau gelatin. Timbang *syringe*, substrat dan sampel uji lalu catat massanya (W2). Tutup *syringe* menggunakan *aluminium foil*. Tempatkan *syringe* di dalam inkubator dan biarkan berdiri secara vertikal selama 48 jam pada suhu  $25^\circ\text{C}$ , setelah itu lepaskan tutupnya. Timbang *syringe* bersama dengan substrat dan sampel uji kemudian catat massanya (W3). Gerakkan *plunger syringe* hingga sampel uji dikeluarkan sambil memastikan bahwa lapisan substrat tetap utuh. Timbang *syringe* dan substrat uji dan catat massanya (W4) [63]. Persentase perubahan berat (W5) ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\%W5 = \left( \frac{(W3-W4)-(W2-W1)}{(W2-W1)} \right) \times 100\% \quad (3.1)$$

W1 = *syringe* dengan substrat; W2 = *syringe* dengan substrat dan sampel uji; W3= *syring* dengan substrat dan sampel uji setelah di inkubasi; W4= lapisan substrat setelah sampel uji dikeluarkan.



### 3.3 SKEMA PENELITIAN



Gambar 3. 3 Skema Penelitian